



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

**Efecto de anticuerpos anti-RNP/Sm y anticoagulante lúpico
sobre la formación de redes extracelulares de neutrófilos
(NETs) en pacientes con lupus eritematoso sistémico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

ALAN ISAAC FUENTES IZALDE



Director de tesis:

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Asesor Interno:

Dr. Alberto Monroy García



Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **FUENTES IZALDE ALAN ISAAC**, con número de cuenta **310015145**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **04 de diciembre de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

VOCAL Dr. CARLOS ROSALES LEDEZMA*

SECRETARIO Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA

SUPLENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de anticuerpos anti-RNP/Sm y anticoagulante lúpico sobre la formación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) en pacientes con lupus eritematoso sistémico.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 05 de noviembre de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Este trabajo de tesis de licenciatura se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma** y fue apoyado en parte por el **Proyecto 254434** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, y en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su hermosa comunidad durante todos estos años y de permitirme vivir las experiencias más inolvidables de mi vida en el ámbito académico y profesional.

Al **Dr. Carlos Rosales Ledezma**, por aceptarme en su grupo de trabajo. Compartir conmigo sus valiosos consejos, regaños, tiempo, paciencia y atención durante el desarrollo de este trabajo. ¡Muchas gracias!

Al **Dr. Alberto Monroy García**, por su apoyo como asesor interno en la elaboración de este trabajo además de compartir su conocimiento y paciencia durante mi formación académica.

Al comité de sinodales conformado por la **Dra. María de Lourdes Mora García**, el **Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**, el **M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez** y el **Dr. Alberto Monroy García**, por sus valiosas observaciones y aportaciones a este trabajo de tesis.

A la **Dra. Andrea Hinojosa**, del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, por proporcionarnos los sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico y por su apoyo académico.

A la **M. en IBB Nancy Yorley Mora Perez** por su excelente ayuda técnica.

Al **Sr. Osvaldo Martínez Garay** por su valioso apoyo como laboratorista.

A todos los docentes y académicos que contribuyeron a mi formación académica y personal.

Dedicatorias

A mi abuela **Guadalupe Isalde Santiago** por apoyarme durante todos estos años y demostrarnos que es posible lograr las metas siempre y cuando uno se lo proponga. Gracias por ser mi inspiración en este pequeño capítulo de mi vida. Te amo.

A mi abuelo **Ricardo Fuentes**, aunque no estés con nosotros aún te tenemos presente.

A mi madre **Gabriela Fuentes Izalde**, y mis tíos **Ricardo Román Fuentes Izalde** y **Martín Alberto Fuentes Izalde** por educarme y acobijarme en la mejor familia que pudiera tener. Sin ustedes no hubiera logrado lo que soy ahora. Los quiero mucho.

A mis amigos biólogos: **Alan Medina, Alberto Monroy, Brian López, Demi Anguiano, Mauricio Salazar, Thelma Parra** y **Uriel Rico**. Han sido mi inspiración y admiración durante estos últimos años de mi vida. Gracias por compartir tantas experiencias juntos. Espero sigan triunfando. Especialmente **Thelma Parra**, por ser una increíble persona y compartir tantas risas, pláticas y momentos durante la carrera. Gracias por todo tu apoyo.

A mis amigos: **Alberto Sainz, Eduardo Reyes, Hugo Saavedra, Isaías Reyes, Jahzeel Reynaga, Rafael Márquez, Ricardo Gómez** y **Ruben Ramírez**. No tengo las palabras para describir todas las aventuras, pláticas, risas y desvelos por los que hemos pasado. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio **Carlos Blanco, Esteban Acosta, Julio Rojas, Martín Acevedo, Rafael Alemán, Valeria Elosa** y **Zayda Fonseca**, por sus consejos, pláticas y risas. Hicieron más amena mi estancia durante el laboratorio.

A **Daniela Abarca Velázquez** por inspirarme a creer en mí y ayudarme a crecer como persona. Espero logres lo que te propongas.

A todos los no mencionados pero que alguna vez se cruzaron durante mi vida. Les deseo mucho éxito en sus metas.

Tabla de contenido

Abreviaturas	I
Resumen	III
Introducción	1
El sistema inmunológico	1
Neutrófilos	3
Generalidades de neutrófilos	3
Morfología y fenotipo de los neutrófilos	3
Función de los neutrófilos	4
Mecanismos antimicrobianos de neutrófilos	5
Fagocitosis	6
Degranulación	7
Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	7
NETosis	9
NETs y enfermedades autoinmunes	10
Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	10
Generalidades y epidemiología del lupus eritematoso sistémico	10
Participación de las NETs en LES	11
Anticuerpos antinucleares	12
Anticuerpos antifosfolípidos	12
Hipótesis	14
Objetivos	14
Objetivos particulares	14
Materiales y métodos	15
Obtención de sueros de pacientes con LES la presencia o ausencia a los autoanticuerpos anti-RNP/Sm y anticoagulante lúpico	15
Obtención de sueros de individuos sanos	15
Obtención y purificación de neutrófilos por gradiente de densidad	16
Observación de NETs mediante microscopia de epifluorescencia	17
Cuantificación de NETs por fluorescencia	18
Análisis estadístico	19

Resultados	20
Discusión	34
Conclusiones	38
Perspectivas	38
Anexos	39
Referencias	45

Abreviaturas

ACPA: Anticuerpos antiproteínas citrulinadas (del inglés *anti-citrullinated protein antibodies*)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AL: Anticoagulante lúpico

ANA: Anticuerpos antinucleares (del inglés *anti-nuclear antibodies*)

ANCA: Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (del inglés *Antineutrophil cytoplasmic antibodies*)

aPL: Anticuerpos antifosfolípidos (del inglés *anti-phospholipids*)

AR: Artritis reumatoide

ARN: Ácido ribonucleico

a β ₂GPI: Anticuerpo anti- β (2)-glicoproteína I

BVAS: *Birmingham Vasculitis Activity Score*

CAR: Colegio Americano de Reumatología

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DC: Célula dendrítica (del inglés *dendritic cells*)

DMSO: Dimetil sulfóxido

ENA: Antígenos extraíbles del núcleo (del inglés *extractable nuclear antigen*).

HSC: Células troncales hematopoyéticas (del inglés *hematopoietic stem cells*)

IC: Inmunocomplejos

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-8: Interleucina 8

IL-17: Interleucina 17

LES: Lupus eritematoso sistémico

LPS: Liposacáridos

MPO: Mieloperoxidasa

NADPH oxidasa: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)

NE: Elastasa de neutrófilo

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilo (del inglés *neutrophil extracellular traps*)

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (NF- κ B)

PAD4: Peptidilarginina desaminasa 4

PAM: Poliangeítis microscópica

PAMPS: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*)

PBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos (del inglés *phosphate buffered saline*)

PFA: Paraformaldehído

PKC: Proteína cinasa C

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato (del inglés *phorbol-12-myristate-13-acetate*)

PMN: Polimorfonuclear

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, *pattern recognition receptor*)

RNP: Ribonucleoproteína

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

RPMI 1640: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute 1640* (del inglés *Roswell Park Memorial Institute Medium*)

SAF: Síndrome antifosfolípidos

SLEDAI-2K: Índice de actividad lúpica del 2000 (del inglés *Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000*)

Sm: Antígeno de Smith

snRNP: Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (del inglés *small nuclear ribonucleoproteins*)

SR-A: Receptor basurero A (del inglés *scavenger receptor A*)

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés *Toll-like receptor*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

U.R.F: Unidades relativas de fluorescencia

VPV: Vasculitis de pequeños vasos

Resumen

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) son los leucocitos más abundantes en circulación sanguínea humana. Durante una infección, los neutrófilos son las primeras células en acudir al sitio de infección. Una vez en el sitio afectado, los neutrófilos llevan a cabo su principal función, la cual es eliminar microorganismos patógenos a través de la fagocitosis, la degranulación y las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Sin embargo, recientemente se ha sugerido la implicación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA del inglés *Antineutrophil cytoplasmic antibodies*) presentes en vasculitis de pequeños vasos (VPV) como los posibles responsables de inducir NETs. Provocando que las NETs tengan un papel contraproducente en pacientes con VPV. No obstante, en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) no se conoce si los autoanticuerpos antirribonucleoproteínas (anti-RNP/Sm) y los anticuerpos anticoagulante lúpico (AL) están participando como posibles inductores de NETs. De tal manera que las NETs tengan un papel perjudicial en pacientes con LES, causando daño vascular y la formación de trombos. El objetivo del presente trabajo fue probar si los sueros de pacientes con LES con presencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y anticuerpos AL tenían la capacidad de inducir la formación de NETs en neutrófilos de donadores sanos. Mediante ensayos de microscopia de epifluorescencia y cuantificación de NETs se demostró el efecto biológico de los sueros de pacientes con LES en neutrófilos de donadores sanos, induciendo la formación de NETs aproximadamente a los 120 minutos después del estímulo, convirtiendo a los sueros de pacientes con LES en un estímulo lento. Además, la formación de NETs al utilizar los sueros de pacientes con LES como estímulo fue débil en comparación con el forbol-12-mirsitato-13-acetato (PMA). Por otro lado, el efecto de los sueros sobre los neutrófilos aparentemente es independiente de los autoanticuerpos anti-RNP/Sm y AL. Finalmente, se observó una tendencia entre la actividad de los sueros de pacientes con LES y el índice del SLEDAI-2K, de tal manera que el suero de pacientes con un estadio de la enfermedad más grave de acuerdo con el SLEDAI-2K tuvieron mayor efecto sobre neutrófilos.

Introducción

El sistema inmunológico

Durante la evolución de los organismos, la selección natural ejerció presión para desarrollar estrategias en contra de agentes infecciosos. El sistema inmunológico surgió con la finalidad de proteger al organismo de microorganismos infecciosos, y mantener su homeostasis (Kindt *et al*, 2007; Murphy *et al*, 2009). El sistema inmunológico, está conformado por tejidos, células y moléculas (péptidos, hormonas y proteínas) con las funciones de reconocimiento y eliminación de agentes extraños al organismo.

Las células del sistema inmunológico reciben el nombre de leucocitos o glóbulos blancos. En mamíferos los leucocitos se originan a partir del proceso de hematopoyesis, llevado a cabo por células troncales hematopoyéticas (HSC, del inglés *hematopoietic stem cells*) presentes en la médula ósea. Entre los leucocitos se encuentran los linfocitos B y T, los neutrófilos, los monocitos, los mastocitos, los eosinófilos y los basófilos. Los linfocitos son células que permanecen en aparentemente estado latente hasta que se encuentran con un antígeno específico, conforme se enfrentan al mismo antígeno aumenta su efectividad. La respuesta de un linfocito a un antígeno no es directa y requiere que primero el antígeno sea “procesado y presentado” por células especializadas conocidas como células presentadoras de antígenos. Estas incluyen a los macrófagos y las células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*).

Las características entre las distintas células del sistema inmunológico y la manera en la que generan inmunidad han llevado a clasificar a la inmunidad en: a) *inmunidad adaptativa* mediada por linfocitos B y T. Esta inmunidad se caracteriza por reaccionar a un amplio número de antígenos, con una respuesta lenta pero con la capacidad de generar memoria, e b) *inmunidad innata* mediada por el resto de los leucocitos, esta inmunidad tiene características opuestas a las de la inmunidad adaptativa, al tener una respuesta más rápida, con la limitante de reconocer un menor número de antígenos y sin la capacidad de generar memoria (Chaplin, 2010).

A pesar de las diferencias entre la inmunidad adaptativa e innata, ambos tipos de inmunidad convergen en mecanismos conocidos como respuestas inmunitarias (Kindt *et al*, 2007; Murphy *et al*, 2009). Las respuestas inmunitarias son procesos orquestados en contra de moléculas, conocidas como antígenos, con la capacidad de activar el sistema inmunológico. Estos antígenos pueden provenir desde microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) e incluir componentes celulares o toxinas liberadas por microorganismos (Warrington *et al*, 2011). Sin embargo, incluso sustancias extrañas no infecciosas pueden desencadenar respuestas inmunitarias, y en ciertas situaciones, moléculas propias del anfitrión también pueden provocar respuestas inmunitarias, a lo que se le conoce como enfermedad autoinmune (Abbas *et al*, 2012).

Las enfermedades autoinmunes son un grupo de patologías caracterizadas por causar daño a células, tejidos y órganos del anfitrión, a través de células autorreactivas inmunológicamente competentes o anticuerpos contra componentes propios del anfitrión. Existen distintos factores que participan en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, como: la inefectiva regulación o eliminación de células autorreactivas, la continua exposición a moléculas propias con alta capacidad inmunógena, la predisposición genética, y los factores ambientales y epigenéticos (Wang *et al*, 2015; Ganapathy *et al*, 2017). Sin embargo, aún es incierto el mecanismo que da inicio a la autoinmunidad, pero se ha sugerido una importante participación de distintos leucocitos entre ellos los neutrófilos, células que se desconoce como contribuyen a la autoinmunidad.

Neutrófilos

Generalidades de neutrófilos

Los neutrófilos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMNs) son los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea humana (Mócsai, 2013; Rosales *et al*, 2016), constituyendo aproximadamente entre el 50 y el 70 % de los leucocitos en circulación (Mesa & Vasquez, 2013; Kolasczkowska & Kubes, 2013). Los neutrófilos posteriormente de ser producidos y madurar en la médula ósea, son liberadas a la circulación sanguínea (Nauseef & Borregaard, 2014). Una vez en circulación sanguínea los neutrófilos son consideradas células de vida corta a diferencia de otros leucocitos (Galli *et al*, 2011; Kolasczkowska & Kubes, 2013); ya que tienen una vida media entre 12 a 15 horas (Mesa & Vasquez, 2013), mientras que en tejidos pueden vivir de 1-2 días (Mayadas *et al*, 2015). Sin embargo, un estudio realizado *in vivo* revela que pueden vivir hasta 5.4 días en circulación sanguínea (Pillay *et al*, 2010).

Morfología y fenotipo de los neutrófilos

Los neutrófilos maduros tienen características morfológicas que permiten distinguirlos de otros leucocitos. Estas características incluyen: un núcleo segmentado con 3 a 5 lóbulos conectados por filamentos finos (Veda, 2011), un diámetro celular aproximado de 12-15 μm , y un citoplasma enriquecido con gránulos y vesículas secretoras (Mesa & Vasquez, 2013) (Figura 1). Los gránulos tienen la función de almacenar y liberar sustancias con la capacidad de eliminar microorganismos. Los gránulos se clasifican en: a) gránulos primarios o azurófilos, los cuales contienen, mieloperoxidasa, azurodicina, lisozima, serina proteasas (como proteinasa 3, elastasa de neutrófilo y catepsina G) y péptidos antimicrobianos (como defensinas). b) gránulos secundarios o específicos, los cuales contienen lactoferrina, pentraxina 3, LL-37 y ficolina 1. c) gránulos terciarios o gránulos de gelatinasa, los cuales contienen metaloproteínasa 9, también conocida como gelatinasa B (Mantovani *et al*, 2011; Kolasczkowska & Kubes, 2013; Mayadas *et al*, 2014).

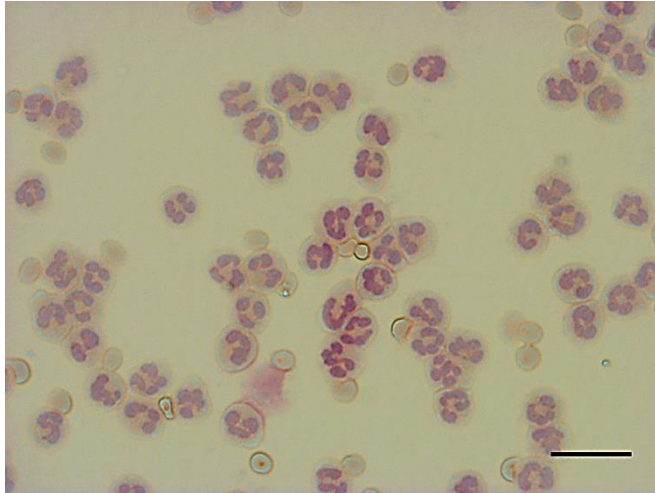


Figura 1. Neutrófilos de humano. Esta célula contiene un núcleo lobulado bien definido, claramente visible de color purpura. También se observa un citoplasma de color ligeramente rosado debido a que no reacciona a colorantes catiónicos ni aniónicos (de ahí su nombre neutrófilo). Tinción Wright-Giemsa. La barra representa 20 μm . Tomado de Alemán, 2016.

Respecto al fenotipo de los neutrófilos humanos, éstos pueden ser caracterizados mediante marcadores de membrana celular. Los marcadores más usados son: CD11b (Mac-1), CD14, CD15, CD16 (Fc γ RIII), CD26L (L-selectina) y CD66b. Aunque estos marcadores no son exclusivos de neutrófilos, se utilizan en combinación para caracterizar a una célula como neutrófilo (Lakschevitz *et al*, 2015; Lakschevitz, 2016). Sin embargo, estos marcadores cambian constantemente su expresión de acuerdo con el tiempo de vida del neutrófilo. Por lo que neutrófilos maduros expresan CD11b⁺, CD14⁻, CD15⁺, CD16⁺ y CD66b⁺ (Dumitru *et al*, 2009; Lakschevitz, 2016), mientras que neutrófilos activados presentan un fenotipo CD11b^{high}, CD15⁺, CD16^{low}, CD66b^{high} y CD62L^{low} (Furtinali *et al*, 2008).

Función de los neutrófilos

Los neutrófilos son un componente esencial de la inmunidad innata, debido a su importante participación durante una respuesta inmune, al ser los primeros leucocitos en migrar de la sangre al tejido o zona de inflamación o de infección. Una vez en el sitio afectado, los neutrófilos llevan a cabo su principal función, la cual es eliminar microorganismos patógenos a través de la fagocitosis (Rosales & Uribe-Querol, 2017). Los neutrófilos también ayudan a regular la respuesta inflamatoria

mediante la liberación de citocinas y quimiocinas (Mantovani *et al*, 2011). A través de estas sustancias los neutrófilos reclutan a otros leucocitos de la inmunidad innata como son macrófagos, basófilos e inclusive leucocitos de la inmunidad adaptativa como linfocitos T (Mantovani *et al*, 2011).

Mecanismos antimicrobianos de neutrófilos

Además de la fagocitosis los neutrófilos utilizan otras dos estrategias antimicrobianas; la degranulación (Kolaczowska & Kobes, 2013; Mayadas *et al*, 2014) y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*; Brinkmann *et al*, 2004; Yam-Puc *et al*, 2012) (Figura 2).

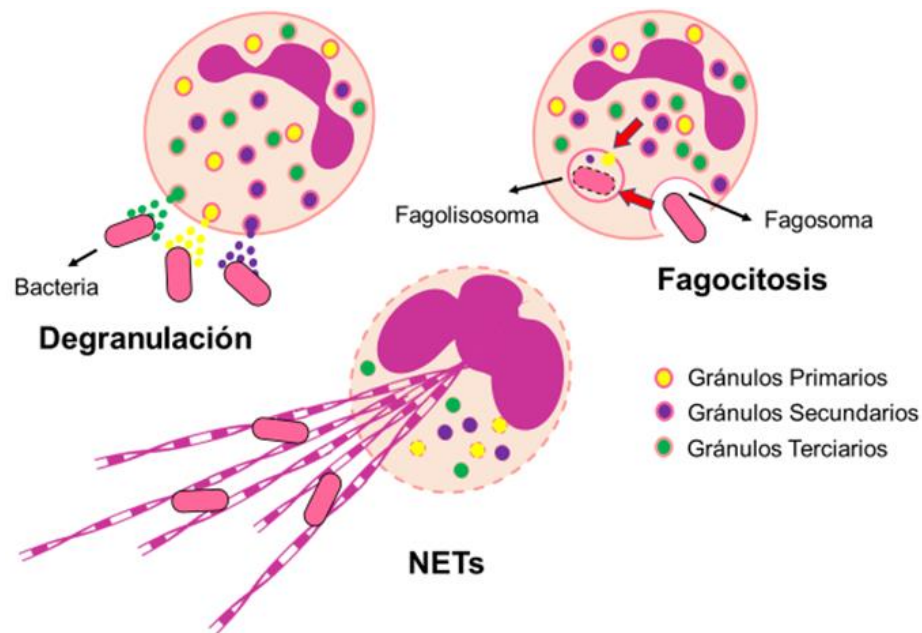


Figura 2. Mecanismos antimicrobianos de neutrófilos. Los neutrófilos son células que acuden a sitios de infección o inflamación. Una vez en la zona afectada, los neutrófilos reconocen y eliminan microorganismos patógenos, a través de la degranulación, la fagocitosis y la formación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs).

Fagocitosis

Los neutrófilos en conjunto con los monocitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos y eosinófilos, reciben el nombre de fagocitos profesionales (Gordon 2016; Rosales & Uribe-Querol, 2017). Estas células tienen la capacidad de fagocitar, esto es reconocer e ingerir partículas o microorganismos más grandes que $0.5 \mu\text{m}$. La partícula fagocitada se incorpora dentro de vesículas llamadas fagosomas (Rosales & Uribe-Querol, 2017). El neutrófilo lleva a cabo el reconocimiento de las partículas para su ingestión mediante receptores de membrana que reconocen directamente microorganismos o indirectamente a través de reconocer opsoninas. Los receptores directos incluyen receptores que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*). Estos receptores se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *pattern recognition receptor*). Ejemplos de estos receptores son: dectina 1, receptores de manosa y el receptor basurero A (SR-A, del inglés *scavenger receptor A*). Los receptores indirectos incluyen a los receptores de anticuerpos, llamados receptores Fc y los receptores del complemento (Rosales & Uribe-Querol, 2017). Los anticuerpos y los componentes del complemento son opsoninas que se unen a la partícula para facilitar su fagocitosis.

La fagocitosis conlleva cascadas de señalización celular, y reacomodos del citoesqueleto para formar el fagosoma (Kruger *et al*, 2015). Una vez formado el fagosoma, éste se fusiona con gránulos primarios y secundarios, además de productos provenientes del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, dando lugar un fagosoma intermedio (Gordon, 2016). Dentro del fagosoma ocurren cambios de pH por el proceso del estallido respiratorio, en el cual la NADPH oxidasa (Amulic *et al*, 2012) cataliza la reducción del O_2 generando el radical superóxido (O_2^-). El radical superóxido pertenece al conjunto de moléculas llamado especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), las cuales tienen actividad microbicida (Hampton *et al*, 1998). El fagosoma intermedio se fusiona a lisosomas dando lugar a un fagolisosoma maduro, dentro del cual se destruye el

microorganismo ingerido. Finalmente, las membranas del fagolisosoma son recicladas (Gordon, 2016).

Degranulación

Los neutrófilos además de fagocitar tienen la capacidad de liberar mediadores proinflamatorios como es el caso de quimiocinas y enzimas digestivas, las cuales son almacenadas en gránulos intracelulares y liberadas a través de una exocitosis regulada. Este proceso ocurre cuando el neutrófilo recibe la estimulación de sus receptores por algún microorganismo, lo que provoca el reclutamiento de los gránulos hacia la membrana plasmática, evento dependiente del citoesqueleto de actina y del ensamblaje de microtúbulos (Burgoyne & Morgan, 2003). La fusión de los gránulos con la membrana plasmática provoca la liberación de las enzimas digestivas hacia la membrana blanco (como un patógeno). Para llevar a cabo este proceso de exocitosis es necesario un incremento de Ca^{2+} intracelular (Lacy, 2006).

Trampas extracelulares de neutrófilos

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), son descritas como fibras compuestas de cromatina e histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) decoradas con proteínas específicas provenientes de los gránulos de los neutrófilos (Figura 3). Algunas de estas proteínas son: MPO, elastasa de neutrófilo (NE), catepsina G, lactoferrina y gelatinasa (Brinkmann *et al*, 2004). Las NETs miden aproximadamente 15 nm de diámetro, y pueden ser degradadas por DNAsas pero no por proteasas, indicando que el principal soporte de las NETs es la cromatina desplegada, probablemente asociada a una cadena de nucleosomas (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Esta estructura permite atrapar y eliminar a los microorganismos (Berger-Achituv *et al*, 2013).

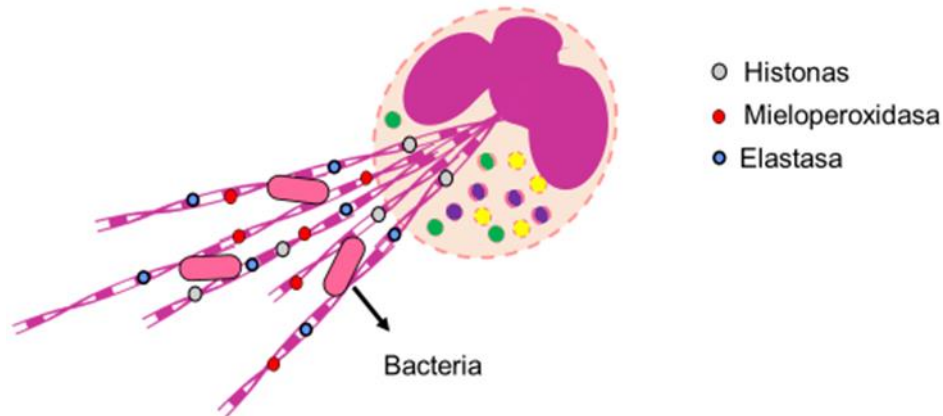


Figura 3. Los neutrófilos liberan redes extracelulares de neutrófilos (NETs), un complejo conformado por nucleosomas (ADN e histonas) adornados con proteínas granulares como la mieloperoxidasa (MPO), la elastasa de neutrófilo (NE) y la catépsina G. Las NETs pueden atrapar microorganismos y eliminarlos.

Existen distintos inductores de NETs, entre los cuales se encuentran agentes biológicos y químicos. Entre los agentes biológicos descritos se encuentran: algunas bacterias, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, hongos, como *Aspergillus fumigatus*, parásitos, como *Plasmodium falciparum* y *Leishmania amazonensis* (Fuchs *et al*, 2007; Bruns *et al*, 2010; Dolgushin & Andreeva, 2009; Baker *et al*, 2008; Guimarães-Costa *et al*, 2009; Ramos-Kichik *et al*, 2009). Entre los agentes químicos descritos se encuentran: lipopolisacáridos (LPS) de algunas bacterias, citocinas como IL-8, y sobre todo el fármaco forbol-12-miristato-13-acetato o PMA (del inglés *phorbol-12-myristate-13-acetate*; Brinkmann *et al*, 2004). El PMA es un inductor de la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Brinkman & Zychlinsky, 2012), la cual induce una cascada de señalización que concluirá con la formación de NETs (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Los receptores que reconocen a los microorganismos y llevan a la formación de NETs no se conocen. Se ha propuesto que los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) y receptores de citocinas pudieran participar, pero esto no se ha demostrado experimentalmente. Solamente se han descrito dos receptores que efectivamente llevan a la formación de NETs; éstos son los receptores para anticuerpos el Fc α RI (Aleyd *et al*, 2014) y el Fc γ RIIIb (Behnen *et al*, 2014; Alemán *et al*, 2016).

NETosis

El proceso de formación de NETs tiene como consecuencia la muerte del neutrófilo. Específicamente a este tipo de muerte celular se ha bautizado con el termino de “NETosis” (Steinberg & Grinstein, 2007) y es un tipo de muerte celular distinto a la necrosis o la apoptosis (Fuchs *et al*, 2007). Un estudio realizado por Brinkman & Zychlinsky (2012) describe los eventos morfológicos ocurridos durante la NETosis, al utilizar como estímulo PMA. Durante los primeros minutos a la activación del neutrófilo ocurre un aplanado de la célula y adhesión de ésta al sustrato. En la siguiente hora ocurre la pérdida de la forma lobular característica del núcleo, la cromatina se descondensa, existe pérdida de la integridad de la membrana nuclear interna y externa, además de que los gránulos se desintegran. Posteriormente a las 3 horas, la envoltura nuclear se disgrega formando vesículas, el nucleoplasma y citoplasma se combinan en una masa homogénea. Finalmente, la membrana plasmática se desintegra y el interior de la célula es expulsado al espacio extracelular formando las NETs.

Los eventos bioquímicos que ocurren en el neutrófilo para llevar a cabo la NETosis inducida por el PMA se han descrito con cierto detalle. Primero ocurre la activación de las PKC directamente por el PMA (Brinkman & Zychlinsky, 2012) lo que ocasiona la activación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK para llevar a cabo la fosforilación de la subunidad gp91^{phox} de la NADPH oxidasa (Hakkim *et al*, 2011). Como consecuencia la NADPH oxidasa se ensambla completa y se generan ROS (Nel *et al*, 2015). La participación de ROS y la NADPH oxidasa son necesarios para llevar a cabo la formación de NETs (Fuchs *et al*, 2007), ya que al utilizar captadores de ROS como Trolox, N-acetil cisteína (Lim *et al*, 2011) o el difenileneiodonio (Fuchs *et al*, 2007) se inhibe la formación de NETs (Kaplan & Radic, 2012).

El papel de ROS es importante en la NETosis debido a que son los responsables de colapsar los gránulos, liberando enzimas como peptidilarginina desaminasa (PAD4), NE, MPO y el polipéptido antimicrobiano LL-37. Estas moléculas son translocadas al núcleo en donde PAD4 realiza modificaciones a las

histonas como la hipercitrulinación, convirtiendo los residuos de arginina a citrulina. Esto provoca la descondensación del ADN debido a un cambio de carga de las histonas de positivo a negativo (Nel *et al*, 2015; Kobayashi, 2015). Además, las enzimas MPO y NE degradan a las histonas ayudando a la descondensación del ADN. Por último, LL-37 degrada la membrana nuclear y la membrana celular, con la finalidad de expulsar el ADN y concluir con la NETosis (Nel *et al*, 2015; Yipp & Kubes, 2013). Durante la NETosis inducida por PMA también se ha reportado un incremento de Ca²⁺ citoplasmático (Fuchs *et al*, 2007; Nel, 2015) y la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) (Lapponi *et al*, 2013), los cuales parecen ser importantes para la NETosis, aunque su participación no es clara todavía.

NETs y enfermedades autoinmunes

La función normal de las NETs es generalmente benéfica ya que éstas sirven para eliminar a los microorganismos patógenos. Sin embargo, recientemente se ha sugerido la participación de las NETs en la complicación de enfermedades autoinmunes. Entre estas enfermedades se encuentran: vasculitis de pequeños vasos (VPV) asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA del inglés *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*), artritis reumatoide (AR), psoriasis, el síndrome antifosfolípido (SAF) y el lupus eritematoso sistémico (LES) (Lee *et al*, 2017). Aunque aún no es claro el papel de las NETs en estas enfermedades autoinmunes, se ha sugerido que pueden participar en un daño vascular, agravando las patologías y contribuyendo a estados trombóticos especialmente en LES (Villanueva *et al*, 2011).

Lupus Eritematoso Sistémico

Generalidades y epidemiología del lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune con un gran número de manifestaciones clínicas. Entre las manifestaciones más comunes se encuentran: daño sistémico a distintos órganos (riñón, corazón, cerebro), daño vascular, eritema, nefritis y dolor. El LES afecta más mujeres jóvenes que a hombres, en una proporción 9:1 (D´Cruz *et al*, 2007). Además, existe una tendencia

en distintos grupos étnicos/raciales a padecer LES (Danchenko *et al*, 2006), como son los afroamericanos, los hispanos y los asiáticos. En contraste, los caucásicos presentan menor predisposición de desarrollar la enfermedad (Ramsey-Goldman & Manzi, 2000). Los datos estadísticos del LES señalan a nivel mundial una incidencia aproximadamente de 1 a 10 casos por cada 100 000 habitantes/año, mientras que la prevalencia se encuentra entre 20 y 70 casos por cada 100 000 habitantes/año (Pons-Estel *et al*, 2010). En México se reporta una prevalencia de 60 casos por cada 100 000 habitantes/año. Con una incidencia del 1.8 a 7.6 casos por cada 100 000 habitantes/año (SSA, 2013). La tasa de supervivencia de los pacientes con LES en Estados Unidos, Canadá y América Latina es por encima del 90 % los primeros 5 años después de la detección de la enfermedad y 80 % después de los 15-20 años del diagnóstico (Pons-Estel *et al*, 2010). La principal causa de mortalidad en pacientes con LES es la presencia de cuadros clínicos asociados a daño vascular y cuadros trombóticos avanzados. Se ha postulado la participación de distintos mecanismos en la contribución al daño vascular. Entre estos mecanismos se ha señalado la participación de las NETs en la formación de trombos (Fuchs *et al*, 2010).

Participación de las NETs en LES

La etiología del LES es desconocida. Sin embargo, existe una serie de factores de riesgo que han sido identificados para que una persona sea susceptible a la enfermedad. Entre estos factores destacan la predisposición genética, la participación de ciertas hormonas (como estrógenos), factores ambientales (como la exposición a rayos ultravioleta, ser fumador e inclusive infecciones virales) o medicamentos (como antibióticos de sulfonamida) (Cunha *et al*, 2013). Por otro lado, la fisiopatología del LES, es caracterizada por la presencia de linfocitos B y T autoreactivos, y la pérdida de tolerancia hacia antígenos propios del anfitrión, principalmente antígenos nucleares y otros componentes de las células. Lo que tiene como consecuencia la generación de autoanticuerpos. A estos autoanticuerpos se les ha bautizado con el nombre anticuerpos antinucleares (ANA, del inglés *anti-nuclear antibodies*) y son importantes marcadores para diagnóstico

del LES. También existe la producción de anticuerpos antifosfolípidos (aPL, del inglés *anti-phospholipids*) y en casos muy particulares de anticuerpos ANCA (Petri, 2006; Yu & Su, 2013; Jesmin *et al*, 2017).

Anticuerpos antinucleares

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se encuentran divididos en dos grandes grupos de anticuerpos, los anticuerpos contra doble cadena de ADN (anti-dsDNA, del inglés *anti-doble stranded DNA*) y los anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA, del inglés *extractable nuclear antigen*). Estos últimos tienen la característica de ser anticuerpos dirigidos principalmente contra proteínas no histonas, asociadas al ácido ribonucleico (ARN). Su nombre deriva de que estos antígenos pueden extraerse con disoluciones salinas de baja fuerza iónica (Bastías *et al*, 2015). Dos anticuerpos pertenecientes al grupo de los ENA son los anticuerpos específicos antirribonucleoproteínas (anti-RNP) (García-Romo *et al*, 2011) y los anticuerpos contra el antígeno Smith (anti-Sm) (Bastías *et al*, 2015). Los anticuerpos anti-RNP también conocidos como anti-U1-RNP, reaccionan principalmente con la proteína U1 de 70 kDa y las proteínas accesorias U1-A y U1-C de la U1-snRNP (ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas, del inglés *small nuclear ribonucleoproteins*). Estas proteínas forman parte del espliceosoma. Mientras que los anticuerpos anti-Sm reaccionan con el núcleo Sm de las snRNP (Urlaub *et al*, 2001; Dema & Charles, 2016; Lemerle & Renaudineau, 2016). Los anticuerpos anti-Sm se detectan entre 5 y 30 % de los pacientes con LES, mientras que los anticuerpos anti-RNP se detectan entre 25 y 47 % de los pacientes con LES. Juntos estos anticuerpos son indicadores de un mal pronóstico en LES (Migliorini *et al*, 2005).

Anticuerpos antifosfolípidos

Además de los anticuerpos ANA, en un 30-40% de pacientes con LES aparecen anticuerpos contra fosfolípidos (aPL) y proteínas asociadas a la membrana celular (Petri, 2000; Petri, 2006). Entre estos anticuerpos se encuentran los que reaccionan con epítomos de fosfolípidos aniónicos, conocidos con el nombre de anticoagulante lúpico (AL) ya que su presencia produce la precipitación y

formación de trombos *in vivo*. Estos anticuerpos interactúan con la membrana de las plaquetas provocando aumento en la adhesión y la agregación de éstas, dando por resultado trombos (Mulliez *et al*, 2015). Por tanto, los pacientes con estos anticuerpos pueden tener un riesgo anormalmente alto de coagulación sanguínea (Cugno *et al*, 2014).

Planteamiento del problema

A partir del descubrimiento de las NETs (Brinkmann *et al*, 2004) se ha descrito que estas estructuras son importantes para la eliminación de microorganismos patógenos. Los estímulos que activan a los neutrófilos para que formen NETs no se conocen en su totalidad. Se sabe que muchos microorganismos y algunos agentes químicos como el PMA y los anticuerpos pueden inducir la formación de NETs. En los últimos años se ha relacionado la formación de NETs con distintas patologías y en especial en la patogénesis y la complicación de enfermedades autoinmunes, como es el caso de lupus eritematoso sistémico (LES) (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Se piensa que las NETs contribuyen a las enfermedades autoinmunes al exponer al sistema inmunológico autoantígenos que normalmente están dentro de las células. Además, en algunos pacientes con LES se presentan cuadros de trombosis inducidos por anticuerpos contra lípidos de membranas celulares. La contribución de los autoanticuerpos presentes en el LES a la activación de neutrófilos para producir NETs no se conoce. Tampoco se conoce si al inducir NETs, estos autoanticuerpos favorecen más estados patológicos secundarios como la trombosis. Por lo tanto, es importante estudiar la interacción de anticuerpos autorreactivos de pacientes con LES con los neutrófilos y determinar su posible participación en la formación de NETs. El presente trabajo pretende comprender mejor el papel de estos anticuerpos como posibles inductores de NETs y su rol durante LES.

Hipótesis

Los sueros de pacientes con LES, positivos a los anticuerpos anti-RNP/Sm y anticoagulante lúpico estimularán neutrófilos de donadores sanos para inducir la formación de NETs.

Objetivos

Analizar si la estimulación de neutrófilos de donadores sanos con sueros de pacientes con LES positivos o negativos a los anticuerpos anti-RNP/Sm y anticuerpos anticoagulante lúpico pueden dar inicio a la formación de NETs.

Objetivos particulares

- Obtener una población homogénea de neutrófilos humanos a partir de sangre periférica de donadores sanos.
- Determinar si los sueros de pacientes con LES pueden ser inductores de la formación de NETs.
- Determinar el tiempo e intensidad en el que los sueros de pacientes con LES estimulan la formación de NETs.

Materiales y métodos

Obtención de sueros de pacientes con LES la presencia o ausencia a los autoanticuerpos anti-RNP/Sm y anticoagulante lúpico

Se utilizaron un total de 17 sueros de pacientes diagnosticados con LES de acuerdo a los criterios establecidos por el colegio americano de reumatología (CAR). Todos los sueros fueron previamente caracterizados a la presencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL. Además de que los pacientes con LES presentaban diferentes estadios de la enfermedad según el índice de actividad lúpica del 2000 (SLEDAI-2K, del inglés *Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000*). Todos los sueros fueron proporcionados por la Dra. Andrea Hinojosa del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán (INCMSZ). Los 17 sueros de los pacientes diagnosticados con LES fueron agrupados de acuerdo con la presencia (positivo) o ausencia (negativo) a los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL (Tabla 1).

Tabla 1. Sueros de pacientes con LES

Grupo	Anticuerpo anti-RNP/Sm	Anticuerpo AL	Suero
1	Positivo (+)	Positivo (+)	I, II, IX y X
2	Negativo (-)	Negativo (-)	III, IV, XI y XII
3	Positivo (+)	Negativo (-)	V, VI, XIII y XIV
4	Negativo (-)	Positivo (+)	VII, VIII, XV, XVI y XVII

Obtención de sueros de individuos sanos

El manejo y uso de la sangre para este trabajo fue aprobado por el comité de bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los sueros de individuos sanos se obtuvieron a partir de 5 ml de sangre periférica de 10 donadores voluntarios. La sangre se depositó en tubos cónicos de 1.5 ml, donde se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. El suero se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos, después el suero se retiró a un tubo limpio. El suero fue almacenado a -20 °C y manejado en condiciones estériles.

Obtención y purificación de neutrófilos por gradiente de densidad

Los neutrófilos fueron obtenidos a partir de sangre periférica humana, proveniente de donadores adultos sanos. El protocolo se ha descrito anteriormente (García-García *et al*, 2010) y se detalla a continuación:

Mediante venopunción se obtuvieron 10 ml de sangre periférica humana. Inmediatamente la sangre fue transferida a un tubo con 2 ml de 6 % Dextran T 500 (número de catálogo 17032001; Pharmacia Fine Chemicals, Suecia) en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, del inglés *phospahte buffered saline*) y 10 UI/ml de Heparina (Pisa, México). La sangre se mezcló por inversión y se dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo el Dextran T 500 favoreció la agregación de los eritrocitos los cuales sedimentaron más rápido, dando lugar a la formación de dos capas: una capa inferior de eritrocitos y una capa superior de plasma rico en leucocitos. A partir del plasma los neutrófilos fueron separados mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (número de catálogo 17144003; GE Healthcare Life Sciences, Suecia). El plasma se transfirió en otro tubo, sobre 5 ml de Ficoll-Paque Plus, sin mezclar, formando dos fases. El tubo se centrifugó a 516 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y, el botón celular formado por neutrófilos, se resuspendió en 10 ml de PBS a 4°C. Los eritrocitos restantes se eliminaron mediante un choque hipotónico. Utilizando 10 ml de disolución hipotónica (35 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, 1 % de albúmina sérica bovina, pH= 7.4) a 4°C, agitando gentilmente con la mano durante 1 minuto. En seguida se añadió 10 ml de solución hipertónica (275 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, 1 % de albúmina sérica bovina, pH= 7.4) a 4°C. Esta suspensión celular se centrifugó a 290 x g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se conservó el botón celular, el cual se resuspendió finalmente en 10 ml de PBS a 4°C. La suspensión de neutrófilos se mantuvo en hielo. Inmediatamente se procedió a realizar el conteo total de neutrófilos mediante una cámara de Neubauer y se consideró la viabilidad celular con ayuda de azul tripano (número de catálogo T8154; Sigma-Aldrich, USA). La efectividad de purificación de neutrófilos por este método fue mayor a 95 % y con una viabilidad por encima del 95 %.

Observación de NETs mediante microscopia de epifluorescencia

Posteriormente a la purificación de los neutrófilos, se procedió a utilizar distintos tratamientos en neutrófilos para dar inicio a la formación de NETs, cada tratamiento se describe a continuación:

Se colocaron 2×10^6 células en 4.5 ml de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (número de catálogo R6504; Sigma-Aldrich, USA) sin suplementar de tal manera que se obtuviera una relación de 4.44×10^5 células/ml.

En una placa de cultivo estéril de 48 pozos de fondo plano (número de catálogo 3548, marca Corning Life Sciences, USA) y en condiciones estériles, se cultivaron 1×10^5 PMN en 225 μ l de medio RPMI 1640 sin suplementar para cada pozo a partir de la suspensión celular a 4.44×10^5 células/ml. La placa se incubó durante 30 minutos a 37° C en una incubadora (modelo 3326, Forma Scientific) con 5 % de CO₂. A continuación, se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/500 de los sueros de pacientes con LES y de los sueros de donares sanos. 25 μ l de cada dilución se colocaron en cada pozo que contenía 225 μ l de la suspensión de neutrófilos. Con esto se obtuvo un volumen final de 250 μ l.

Otro tratamiento consistió en utilizar PMA (Número de catálogo P 8139; Sigma-Aldrich, USA), conocido por ser fuerte inductor de NETs. A cada pozo de la placa se añadieron 25 μ l de una disolución de 200 nM de PMA para obtener una concentración final de 20 nM por pozo en un volumen final de 250 μ l. Posteriormente se incubó la placa durante 4 horas a 37°C y 5 % CO₂. Una vez transcurrido el tiempo, las células se fijaron con 250 μ l de paraformaldehído (PFA) (número de catálogo P 6148; Sigma-Aldrich, USA) al 4% (obteniendo una concentración final 2%). La placa se dejó incubar durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Posteriormente a la fijación de las células, se preparó una disolución de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; número de catálogo 268298; Calbiochem, USA) a 300 nM y 0.2 % de Triton X-100 (Número de catálogo T 8787; Sigma-Aldrich, USA) en PBS. A cada pozo de la placa se le agregó 250 μ l de la disolución de DAPI

a 300 nM y Triton X-100 al 0.2%. De tal manera que se obtuviera una concentración final de DAPI a 150 nM y 0.1 % de Triton X-100 por pozo. Se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

A continuación, se tomaron fotografías de la placa con un microscopio de invertido modelo IX 70, Olympus (Center Valley, PA) con aditamentos para epifluorescencia y para captura de imágenes con una cámara digital (Evolution VF Color MediaCybernetics). En cada tratamiento se contaron los núcleos descondensados y se determinó el porcentaje de NETs, calculando la proporción de núcleos descondensados entre núcleos totales. Cada micrografía fue realizada en una magnificación de 200 aumentos y procesada con el programa Image J 1.47v (National Institutes of Health; Bethesda, USA; <http://imagen.nih.gov/ij/>).

Cuantificación de NETs por fluorescencia

Se resuspendieron 5×10^6 células en 5 ml de una disolución de Sytox Green (número de catálogo S 7020; Invitrogen, USA) a 625 nM en RPMI 1640 sin suplementar, obteniendo una relación 1×10^6 células/ml. En una placa de 96 pozos estéril (número de catálogo 3590, marca Corning Life Sciences, USA) se colocaron 1×10^5 células en 100 μ l de RPMI 1640-Sytox Green a 625 nM por pozo. La placa se incubó durante 30 minutos a 37° C en una incubadora (modelo 3326, Forma Scientific) con 5 % de CO₂.

Como control positivo se utilizó PMA de tal manera que se agregó 25 μ l de una disolución de PMA a 100 nM por cada pozo, dando como volumen final 125 μ l y una concentración de PMA de 20 nM. Para los sueros, se preparó una dilución 1/100 de cada uno de los sueros de pacientes con LES y cada uno de los sueros de donares sanos. 25 μ l de estas diluciones se agregaron a cada uno de los pozos, obteniendo un volumen final de 125 μ l, una dilución del suero a 1/500 y Sytox Green a 500 nM. Cada condición experimental se analizó por triplicado en tres ensayos independientes.

Una vez realizado lo anterior se procedió a realizar la lectura de la placa en un lector de placas modelo Synergy TH, marca BioTek (Winooski, VT) con filtros para fluorescencia de excitación a 485 nm y de emisión a 528 nm durante 4 horas, a una temperatura de 36 °C. Se tomaron lecturas cada 5 minutos.

Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos representan la media \pm error estándar de la media (E.E.M), y fueron graficados mediante el programa Origin Pro-8 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA). Los datos fueron analizados con el programa KhaleidaGraph, versión 4.1 (Synergy Software) a través de un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Dunnet. Las diferencias se consideran significativas cuando la $p < 0.05$.

Resultados

Los sueros de individuos sanos no inducen la formación de NETs por neutrófilos normales

Con la finalidad de conocer la capacidad de los sueros de individuos sanos para inducir la formación de NETs en neutrófilos se realizaron ensayos de microscopia de fluorescencia y tinciones de material genético (ADN) con DAPI. Los neutrófilos sin ningún tratamiento presentan material genético altamente condensado, dentro del núcleo y que presenta la típica forma lobulada, característica de neutrófilos (Figura 4 C). Por otra parte, cuando los neutrófilos son tratados con 20 nM de PMA, existe descondensación del material genético, hay pérdida de la forma lobulada del núcleo y el ADN es expulsado al medio extracelular formando NETs (Figura 4 D).

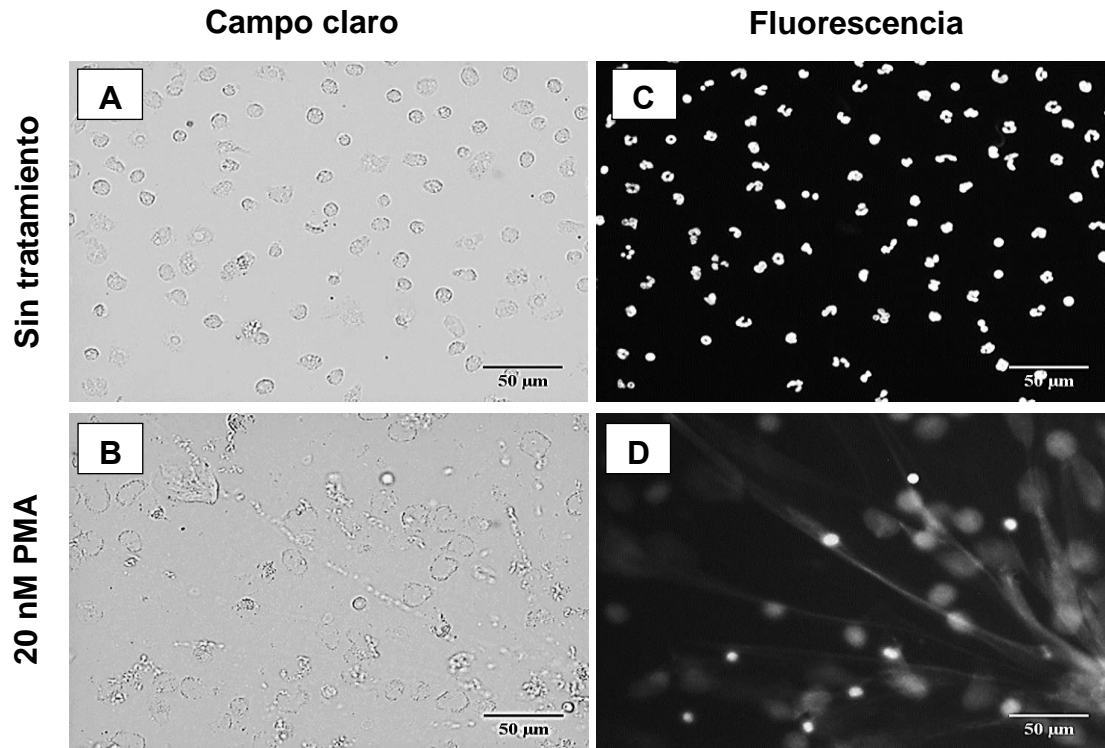


Figura 4. Los neutrófilos forman NETs al ser estimulados con PMA. Neutrófilos humanos sin tratamiento (A) y (C) o estimulados con 20 nM de PMA (B) y (D), fueron teñidos con DAPI y observados en campo claro (A) y (B) o con fluorescencia (C) y (D). Las micrografías fueron tomadas en una magnificación de 200 aumentos y representan más de 8 experimentos. La barra representa 50 µm.

Cuando los neutrófilos se trataron con sueros de individuos sanos a diluciones de 1/10, 1/100 y 1/500, los neutrófilos conservaron sus núcleos compactos y con forma de lobulada (Figura 5 D, E y F), similar a los neutrófilos sin ningún tratamiento (Figura 5 A, B y C). Indicando que los sueros de individuos sanos no estimulan a los neutrófilos a formar NETs en ninguna de las diluciones mencionadas anteriormente.

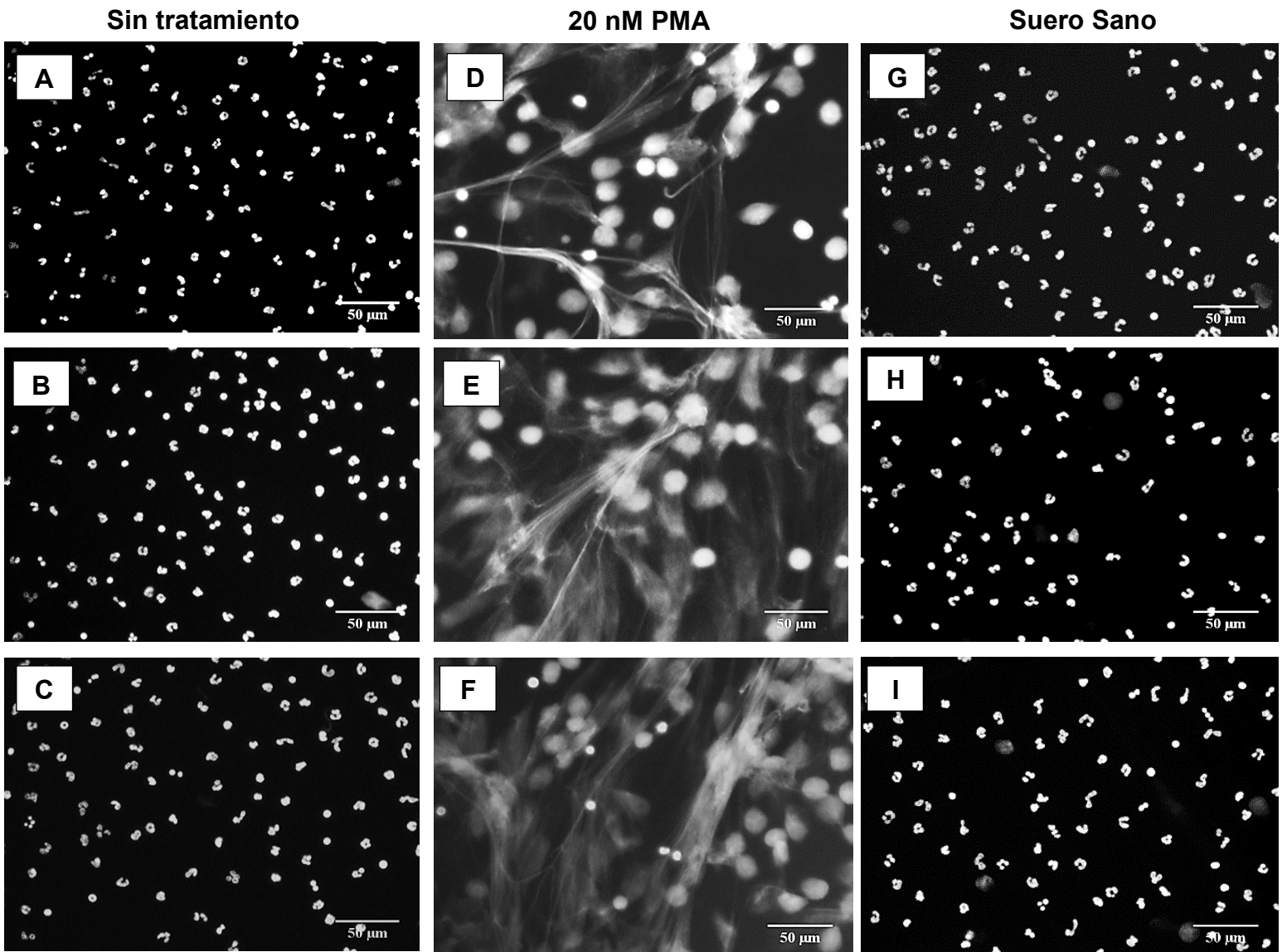


Figura 5. Los tratamientos con sueros de individuos sanos no estimulan a los neutrófilos a formar NETs. (A), (B) y (C) Neutrófilos sin ningún tratamiento. (D), (E) y (F) Neutrófilos tratados con 20 nM de PMA. (G), (H) y (I) Neutrófilos tratados con suero de un individuo sano a una dilución de 1/10, 1/100 y 1/500, respectivamente. Después de cuatro horas, a los neutrófilos se les realizaron tinciones para ADN (DAPI). Las micrografías fueron tomadas en una magnificación de 200 aumentos y representan más de 8 experimentos. La barra representa 50 µm.

Los sueros de pacientes diagnosticados con LES inducen la formación de NETs en neutrófilos normales

Una vez demostrado que los sueros de individuos sanos no inducen la formación de NETs, se procedió a comprobar si los sueros de pacientes diagnosticados con LES podían inducir la formación de NETs en neutrófilos. Por lo que se sometió a neutrófilos a un tratamiento con 17 sueros diferentes de pacientes con LES en diluciones de 1/10, 1/100 y 1/500. Obteniendo como resultado que solo los tratamientos con los sueros I (Figura 6 [D, E y F]) y IV (Figura 6 [G, H e I]) indujeron la formación de NETs a las tres diluciones, como lo refleja, la presencia de núcleos descondensados y ADN extracelular. El tratamiento con suero de individuo sano no indujo la formación de NETs (Figura 6 [A, B y C]).

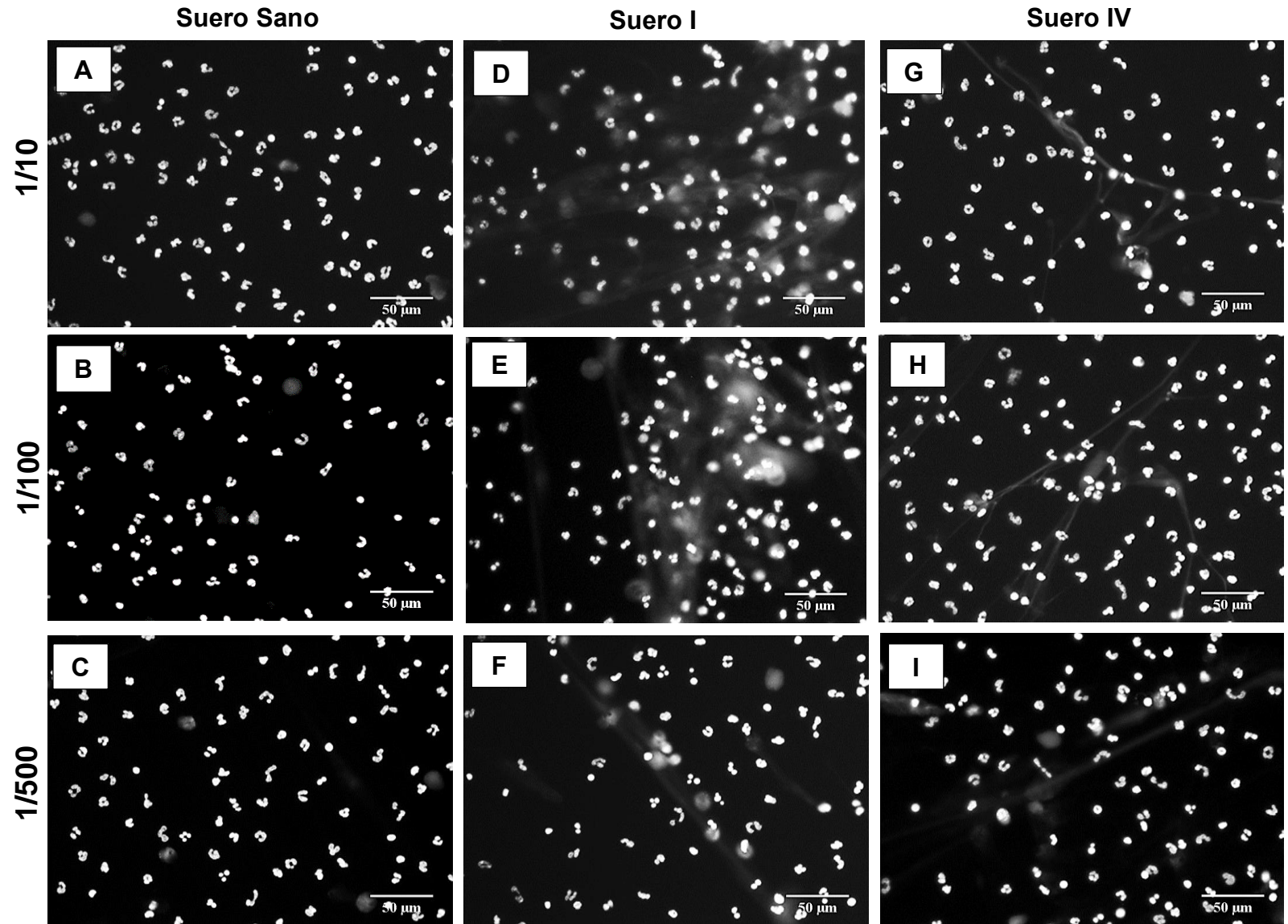


Figura 6. Los tratamientos con los sueros I y IV de pacientes con LES estimulan a los neutrófilos a formar NETs. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/10 con: (A) suero de un individuo sano, (D) suero I y (G) suero IV de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/100 con: (B) suero de un individuo sano, (E) suero I y (H) suero IV de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/500 con: (C) suero de un individuo sano, (F) suero I y (I) suero IV de pacientes diagnosticados con LES. Después de cuatro horas, a los neutrófilos se les realizaron tinciones para ADN (DAPI). Las micrografías fueron tomadas en una magnificación de 200 aumentos y representan 3 experimentos. La barra representa 50 μm .

Los sueros XII (Figura 7 [D, E y F]) y XIII (Figura 7 [G, H e I]) indujeron fuertemente la formación de NETs a diluciones 1/100 y 1/500. De igual manera los sueros XIV (Figura 8 [D,E y F]) y XVI (Figura 8 [G, H e I]) indujeron eficientemente la formación de NETs.

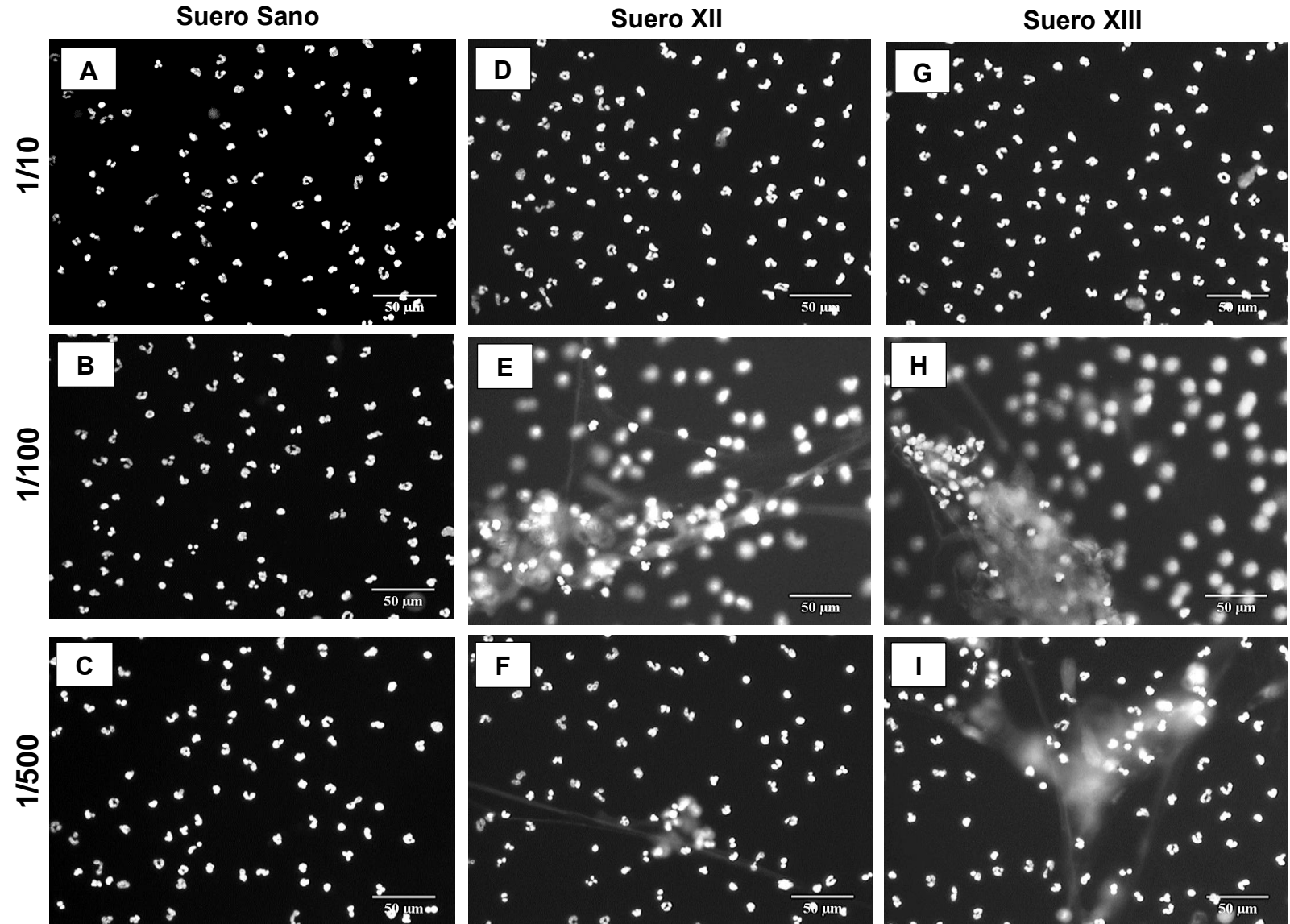


Figura 7. Los tratamientos con los sueros XII y XIII de pacientes con LES estimulan a los neutrófilos a formar de NETs. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/10 con: (A) suero de un individuo sano, (D) suero XII y (G) suero XIII de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/100 con: (B) suero de un individuo sano, (E) suero XII y (H) suero XIII de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/500 con: (C) suero de un individuo sano, (F) suero XII y (I) suero XIII de pacientes diagnosticados con LES. Después de cuatro horas, a los neutrófilos se les realizaron tinciones para ADN (DAPI). Las micrografías fueron tomadas en una magnificación de 200 aumentos y representan 3 experimentos. La barra representa 50 µm.

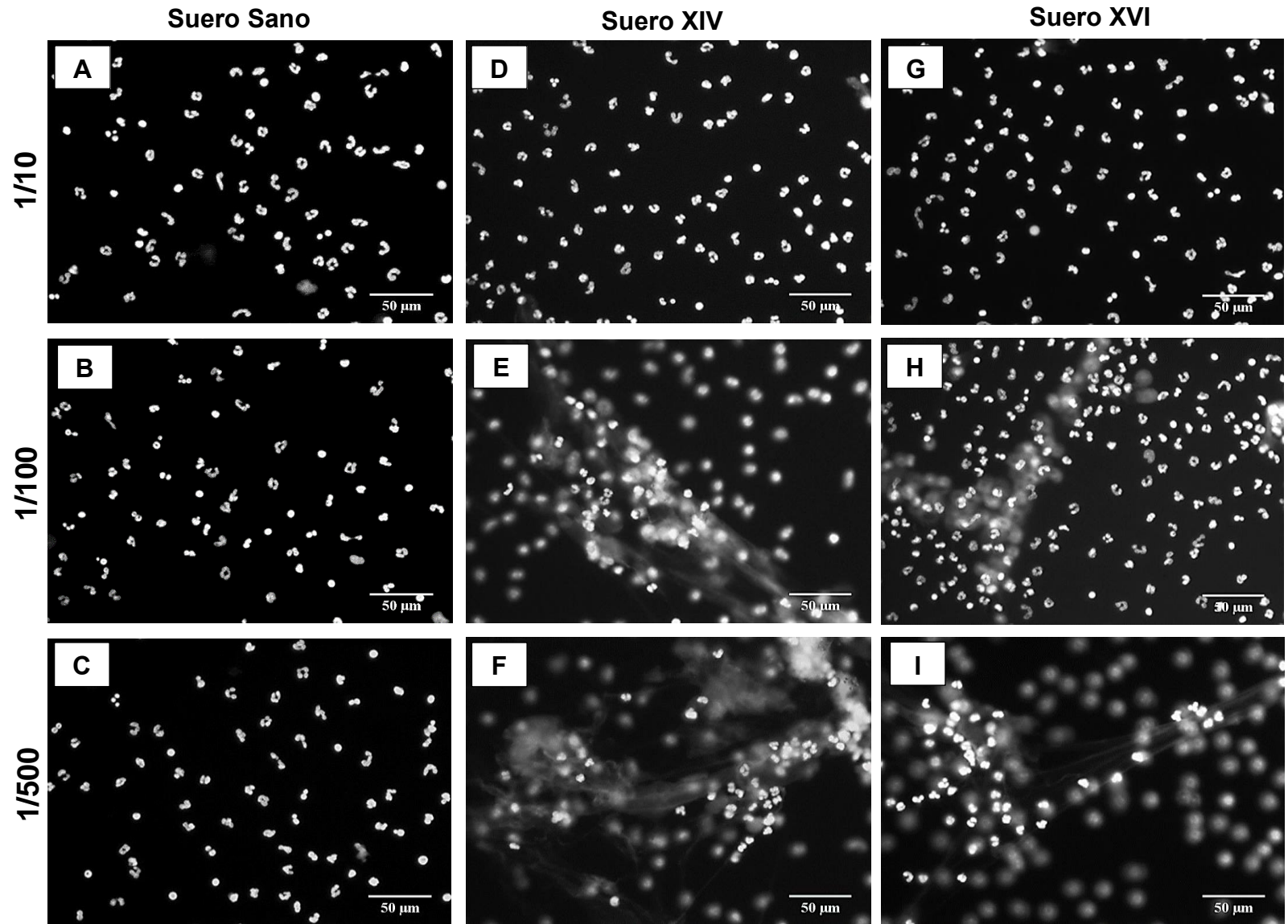


Figura 8. Los tratamientos con los sueros XIV y XVI de pacientes con LES estimulan a los neutrófilos a formar de NETs. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/10 con: (A) suero de un individuo sano, (D) suero XIV y (G) suero XVI de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/100 con: (B) suero de un individuo sano, (E) suero XIV y (H) suero XVI de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/500 con: (C) suero de un individuo sano, (F) suero XIV y (I) suero XVI de pacientes diagnosticados con LES. Después de cuatro horas, a los neutrófilos se les realizaron tinciones para ADN (DAPI). Las micrografías fueron tomadas en una magnificación de 200 aumentos y representan 3 experimentos. La barra representa 50 µm.

Contrario a este resultado, los sueros V (Figura 9 [D,E y F]), X (Figura 9 [G,H e I]) y XV (Figura 9 [J,K y L]) de pacientes con LES, no indujeron la formación de NETs por neutrófilos en ninguna de las tres diluciones. Similar al tratamiento con sueros de individuos sanos (Figura 9 [A, B y C]), se observó alta condensación del material genético y la típica forma lobulada del núcleo.

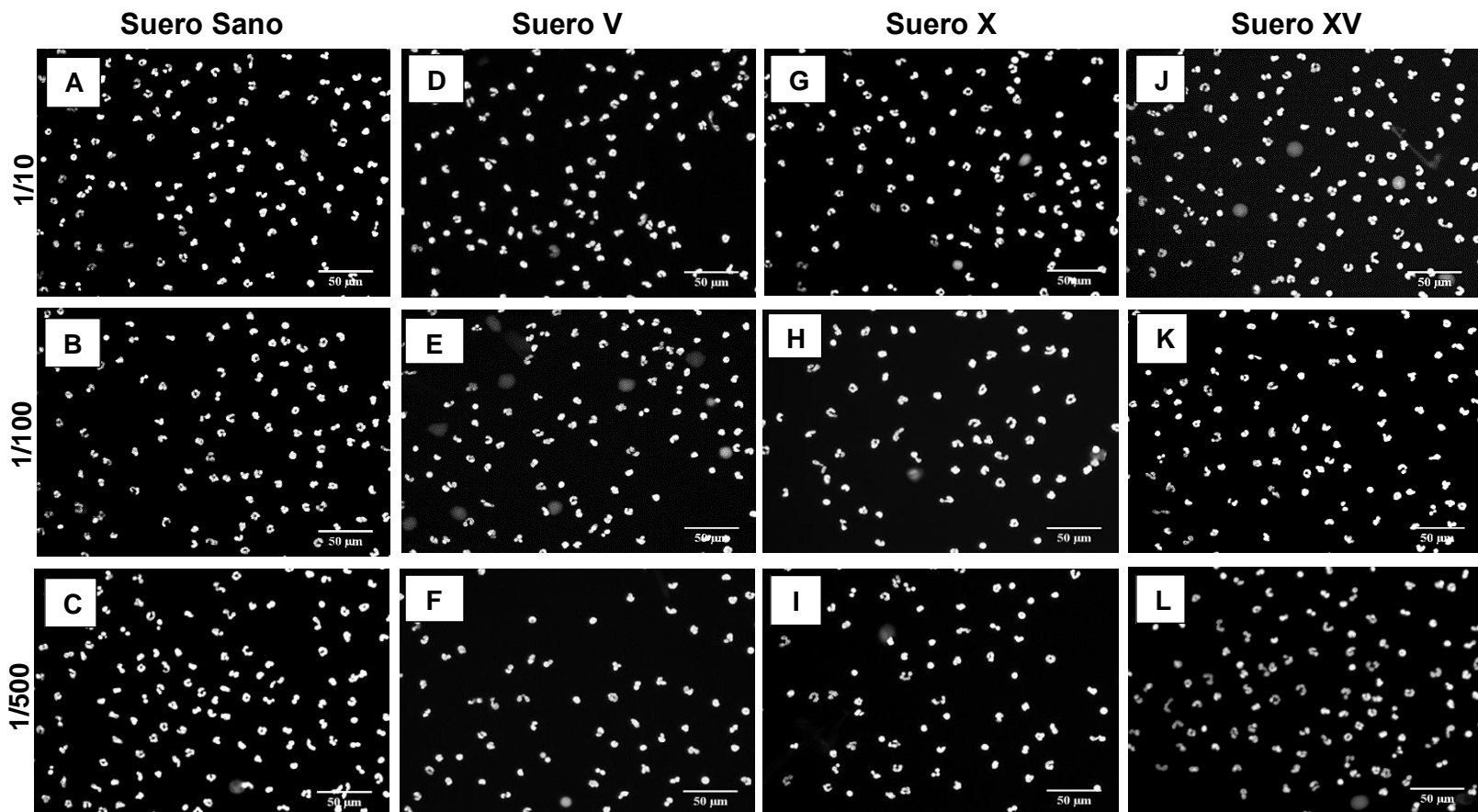


Figura 9. Los tratamientos con los sueros V, X y XV de pacientes con LES no estimulan a los neutrófilos a formar NETs. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/10 con: (A) suero de un individuo sano, (D) suero V, (G) suero X y (J) suero XV de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/100 con: (B) suero de un individuo sano, (E) suero V, (H) suero X y (K) suero XV de pacientes diagnosticados con LES. Neutrófilos tratados a una dilución de 1/500 con: (C) suero de un individuo sano, (F) suero V, (I) suero X y (L) suero XV de pacientes diagnosticados con LES. Después de cuatro horas, a los neutrófilos se les realizaron tinciones para ADN (DAPI). Las micrográficas fueron tomadas en una magnificación de 200 aumentos y representan 3 experimentos. La barra representa 50 µm.

Los 17 sueros de pacientes con LES mostraron diferente actividad sobre los neutrófilos, por lo que se procedió a calcular la actividad de cada suero sobre los neutrófilos tomando como criterio el porcentaje de núcleos descondensados. En el anexo II se muestra el porcentaje de los núcleos descondensados respecto a los núcleos totales y los criterios de la actividad de los sueros. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 2, donde se observa que los tratamientos con sueros de pacientes con LES con mayor efecto sobre los neutrófilos fueron: I, XI, XII, XIII, XIV y XVI. En cambio, los sueros II, VIII, IX y XVII, tuvieron un efecto moderado para inducir NETs. Los sueros III, IV, VI y VII mostraron muy poco efecto y los sueros V, X y XV no indujeron la formación de NETs. Es de hacer notar que aun los sueros para inducir NETs, lo hicieron a un nivel siempre menor que el inducido por PMA.

	Sano	Suero I	Suero II	Suero III	Suero IV	Suero V	Suero VI	Suero VII	Suero VIII	Suero IX	Suero X	Suero XI	Suero XII	Suero XIII	Suero XIV	Suero XV	Suero XVI	Suero XVII	20 nM PMA
Dilución 1/10	-	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dilución 1/100	-	+++	+	-	+	-	+	+	++	++	-	-	+++	+++	+++	-	++	-	+++++
Dilución 1/500	-	+	++	+	+	-	+	+	+	++	-	+++	+	+++	+++	-	+++	++	+++++

Tabla 2. Formación de NETs en neutrófilos sometidos a un tratamiento con 20 nM de PMA, sueros de individuos sanos (n=10) y sueros de pacientes con LES (n=17) a las diluciones 1/10, 1/100 y 1/500. (-) nula formación de NETs (verde); (+) poca formación de NETs (amarillo); (++) moderada formación de NETs (naranja); (+++) alta formación de NETs (rojo); (+++++) fuerte formación de NETs (púrpura). Estos criterios fueron estimados con base al porcentaje de núcleos descondensados (Anexo II).

Todos los sueros de pacientes con LES no indujeron la formación de NETs de igual manera. Incluso algunos sueros no tuvieron ningún efecto. Como se mencionó en la introducción, los pacientes con LES pueden tener anticuerpos específicos antirribonucleoproteínas (anti-RNP/Sm) y también anticuerpos

específicos antifosfolípidos aniónicos, conocidos como anticoagulante lúpico (AL). Para buscar una posible relación entre la presencia de estos anticuerpos y la capacidad de un suero para inducir NETs, los sueros de los pacientes se agruparon de acuerdo con la presencia o ausencia de los anticuerpos mencionados. El **Grupo 1**: positivo a anti-RNP/Sm y positivo a AL. El **Grupo 2**: negativo a anti-RNP/Sm y negativo a AL. El **Grupo 3**: positivo a anti-RNP/Sm y negativo a AL. El **Grupo 4**: positivo a AL y negativo a anti-RNP/Sm. En el grupo 1 se encontraron sueros que inducían NETs, pero también un suero que no lo hizo (Tabla 3). En el grupo 2, dos sueros estimularon poco la formación de NETs, pero otros dos sueros fueron muy eficientes en inducir NETs (Tabla 4).

Grupo 1	Anti-RNP/Sm	AL
	<i>Positivo</i>	<i>Positivo</i>

	Suero I	Suero II	Suero IX	Suero X
Dilución 1/10	+++	-	-	-
Dilución 1/100	+++	+	++	-
Dilución 1/500	+	++	++	-

Tabla 3. Sueros positivos a los anticuerpos anti-RNP/Sm y positivos a los anticuerpos AL. La actividad de los sueros para estimular la formación de NETs: ninguna (*verde*); poca (*amarillo*); moderada (*naranja*) y alta (*Rojo*).

Grupo 2	Anti-RNP/Sm	AL
	<i>Negativo</i>	<i>Negativo</i>

	Suero III	Suero IV	Suero XI	Suero XII
Dilución 1/10	-	+	-	-
Dilución 1/100	-	+	-	+++
Dilución 1/500	+	+	+++	+

Tabla 4. Sueros negativos a los anticuerpos anti-RNP/Sm y negativos a los anticuerpos AL. La actividad de los sueros para estimular la formación de NETs: ninguna (*verde*); poca (*amarillo*); moderada (*naranja*) y alta (*Rojo*).

En el grupo 3 se encontraron dos sueros no indujeron NETs eficientemente, pero dos sueros que sí estimularon eficientemente la formación de NETs (Tabla 5). Finalmente, en el Grupo 4 se encontraron sueros que indujeron pocas NETs, pero un suero muy potente para inducir NETs (Tabla 6).

Grupo 3	Anti-RNP/Sm	AL
	Positivo	<i>Negativo</i>

	Suero V	Suero VI	Suero XIII	Suero XIV
Dilución 1/10	-	-	-	-
Dilución 1/100	-	+	+++	+++
Dilución 1/500	-	+	+++	+++

Tabla 5. Sueros positivos a los anticuerpos anti-RNP/Sm y negativos a los anticuerpos AL. La actividad de los sueros para estimular la formación de NETs: ninguna (verde); poca (amarillo); moderada (naranja) y alta (Rojo).

Grupo 4	Anti-RNP/Sm	AL
	<i>Negativo</i>	Positivo

	Suero VII	Suero VIII	Suero XV	Suero XVI	Suero XVII
Dilución 1/10	-	-	-	-	-
Dilución 1/100	+	++	-	++	-
Dilución 1/500	+	+	-	+++	++

Tabla 6. Sueros negativos a los anticuerpos anti-RNP/Sm y positivos a los anticuerpos AL. La actividad de los sueros para estimular la formación de NETs: ninguna (verde); poca (amarillo); moderada (naranja) y alta (Rojo).

Los resultados de los 4 grupos indican que no existe relación entre la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm o los anticuerpos AL y la capacidad del suero para estimular a los neutrófilos a que produzca NETs. A pesar de no existir una correlación entre la presencia o ausencia de los anticuerpos en los sueros y la capacidad de inducir NETs, claramente algunos sueros son más potentes para activar a los neutrófilos que otros. Al ordenar los sueros de acuerdo con la gravedad de la enfermedad en el paciente, según la clasificación del SLEDAI-2K, se observó que los sueros de los pacientes con un estadio del SLEDAI-2K

mayor tuvieron mayor efecto sobre neutrófilos para inducir NETs (Tabla 7). La escala del SLEDAI-2K asigna un valor ascendente del 0 al 8, dependiendo de la gravedad de los síntomas del paciente. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que los pacientes con un estadio de la enfermedad más grave podrían ser propensos a generar más NETs en la circulación sanguínea (Tabla 7).

	Sano	Suero I	Suero II	Suero III	Suero IV	Suero V	Suero VI	Suero VII	Suero VIII	Suero IX	Suero X	Suero XI	Suero XII	Suero XIII	Suero XIV	Suero XV	Suero XVI	Suero XVII
Dilución 1/10	-	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dilución 1/100	-	+++	+	-	+	-	+	+	++	++	-	-	+++	+++	+++	-	++	-
Dilución 1/500	-	+	++	+	+	-	+	+	+	++	-	+++	+	+++	+++	-	+++	++
SLEDAI-2K	-	0	0	0	0	0	0	0	0	≥7	≥7	≥7	≥7	≥7	≥7	≥7	≥7	≥7

Tabla 7. Formación de NETs en neutrófilos sometidos a un tratamiento con sueros de individuos sanos (n=10) y sueros de pacientes con LES (n=17) a las diluciones 1/10, 1/100 y 1/500 (-) nula formación de NETs (**verde**); (+) poca formación de NETs (**amarillo**); (++) moderada formación de NETs (**naranja**); (+++) alta formación de NETs (**rojo**). Estos criterios fueron estimados con base al porcentaje de núcleos descondensados (Anexo II). Además, se muestra el estadio de la enfermedad de los pacientes con LES de acuerdo con el SLEDAI-2K, (0= leve; ≥7= grave).

Los sueros de pacientes diagnosticados con LES inducen una lenta formación de NETs en neutrófilos normales

Ya que los sueros de pacientes con LES mostraron una tendencia a formar NETs de acuerdo con el grado del SLEDAI-2K se repitieron los experimentos para cuantificar las NETs con otro método. El ADN extracelular puede ser detectado mediante la fluorescencia de SYTOX Green, un colorante que fluoresce al unirse al ADN y que no es permeable a las células. Por tanto, al poner SYTOX Green en el medio de cultivo se puede estimar la rapidez e intensidad de la liberación del ADN. En estas condiciones se encontró que los sueros de los pacientes con LES resultan ser un lento inductor de NETs (Figura 10). Los sueros al igual que el PMA activan a

los neutrófilos y éstos comienzan a liberar ADN alrededor de 120 minutos después del estímulo. A las 4 horas de estimulación, la cantidad relativa de NETs, reportada en unidades relativas de fluorescencia (U.R.F), llega a un máximo. Los sueros de pacientes con LES también inducen la formación de NETs, pero la cantidad de éstas siempre fue menor a la inducida por el PMA (Figura 10). Estos resultados señalan que los sueros de pacientes con LES inducen la formación de NETs, pero de una manera muy débil en comparación con el tratamiento de 20 nM de PMA.

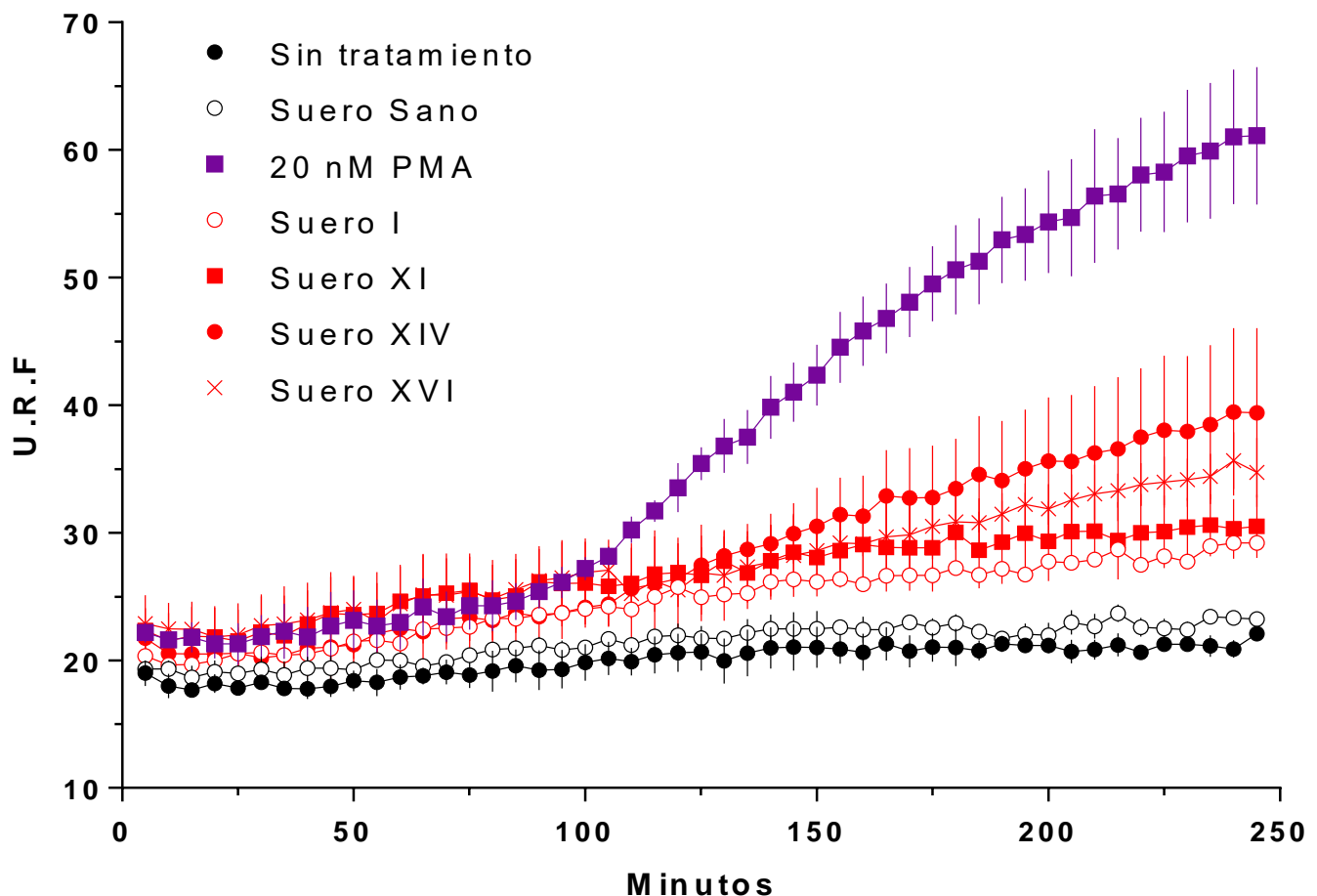


Figura 10. Los sueros de pacientes con LES inducen una lenta formación de NETs en neutrófilos. Se muestra la cuantificación de NETs en neutrófilos sometidos a: ningún tratamiento, con 20 nM de PMA, con un tratamiento con el suero de individuos sanos (n=10) y con sueros de pacientes con LES (I, XI, XIV y XVI) pertenecientes al grupo 1 (+/- anti-RNP/Sm-AL), grupo 2 (-/- anti-RNP/Sm-AL), grupo 3 (+/- anti-RNP/Sm-AL) y grupo 4 (-/+ anti-RNP/Sm-AL), respectivamente. La relativa cantidad de NETs fue estimada mediante la fluorescencia de SYTOX Green por unidades relativas de fluorescencia (U.R.F) de tal manera que se realizaron lecturas cada 5 minutos durante 4 horas. Los datos mostrados son la media \pm E.E.M de 3 experimentos independientes.

La cuantificación de NETs inducida por todos los sueros de pacientes con LES mostró nuevamente que no hay una correlación entre la capacidad de inducir formación de NETs y la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL (Anexo III). Por consiguiente, se procedió analizar los distintos sueros de acuerdo con el índice SLEDAI-2K de los pacientes (Figura 11). Nuevamente se observó que los sueros de los pacientes con mayor índice del SLEDAI-2K presentan una mayor tendencia a formar más NETs. De tal manera que los sueros IX, XI, XII, XIII, XIV, XVI y XVII de pacientes con índice del SLEDAI-2K mayor mostraron mayor formación de NETs, mientras que los sueros I, II, III, IV, VI, VII y VIII pertenecientes al grupo de pacientes con un índice del SLEDAI-2K menor indujeron menor cantidad de NETs (Figura 11).

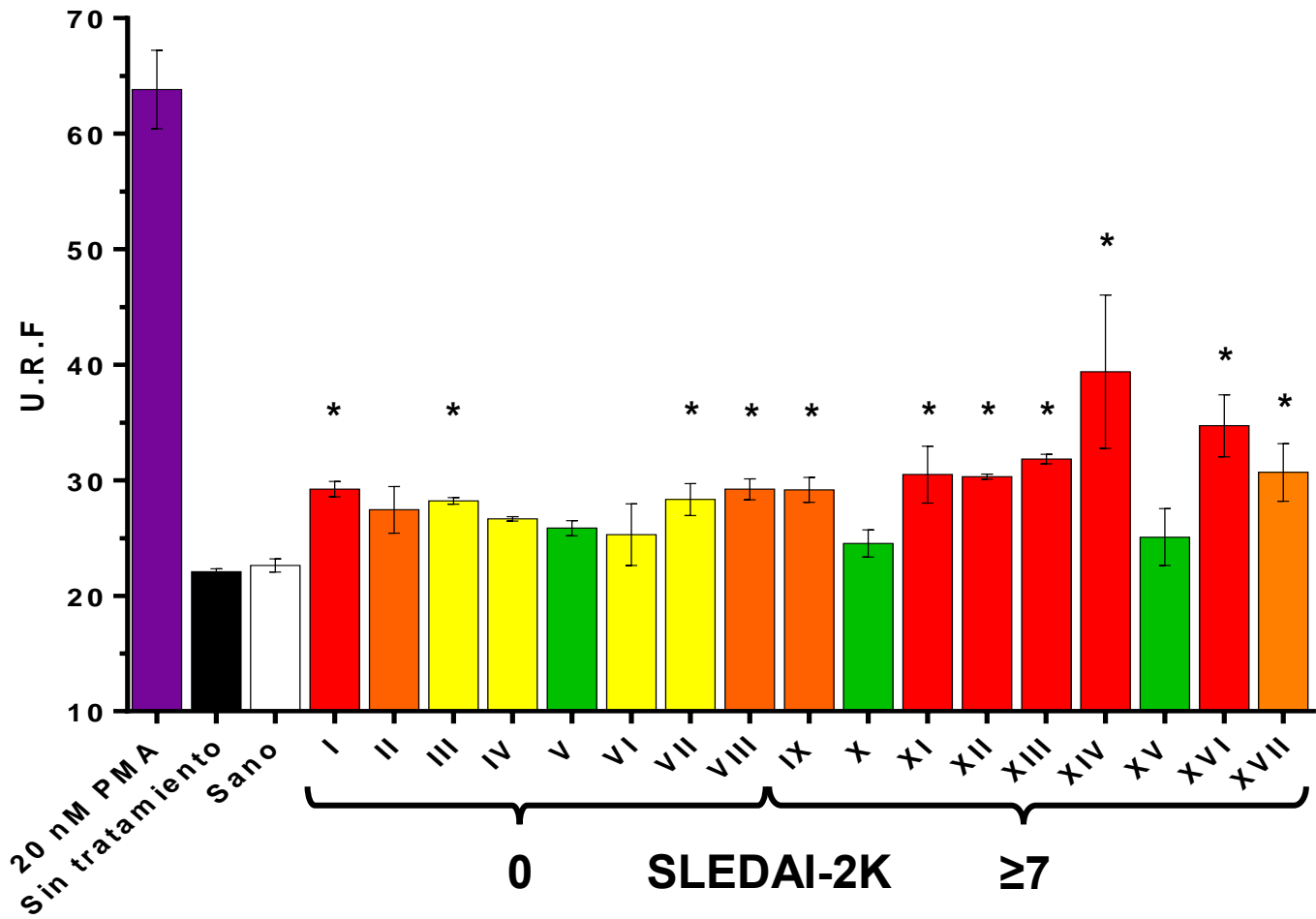


Figura 11. Los sueros de pacientes con LES con mayor actividad de acuerdo con el SLEDAI-2K inducen mayor formación de NETs. De izquierda a derecha se observa neutrófilos: bajo un tratamiento de 20 nM de PMA ningún tratamiento, en un tratamiento con sueros de un individuos sanos (n=10), y en un tratamiento con sueros de pacientes con LES (I al VIII) con un estadio poco avanzado de acuerdo con el SLEDAI-2K (=0) y bajo un tratamiento con sueros de pacientes con LES (IX al XVII) con un estadio de la enfermedad avanzado de acuerdo con el SLEDAI-2K (≥ 7). La relativa cantidad de NETs fue estimada mediante la fluorescencia de SYTOX Green en unidades relativas de fluorescencia (U.R.F.) a las 4 horas después de colocar el estímulo. Los datos mostrados son la media \pm E.E.M de 3 experimentos independientes. Los colores representan la capacidad del suero para inducir la formación de NETs (**Anexo III**). El asterisco señala los tratamientos en donde se encontró diferencias significativas respecto al tratamiento con el suero de un individuo sano ($p < 0.05$).

Discusión

Las enfermedades autoinmunes son patologías complejas y multifactoriales, en las cuales se ven implicados diversos mecanismos que involucran diferentes leucocitos entre ellos los neutrófilos. Los mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos generalmente son benéficos. Sin embargo, durante las enfermedades autoinmunes dichos mecanismos se vuelven perjudiciales en contra del anfitrión. Recientemente se ha propuesto que los neutrófilos a través su mecanismo antimicrobiano conocido como NETs, juega un papel importante al causar daño vascular particularmente en pacientes con LES (Hakkim *et al*, 2010). En Estados Unidos, Canadá y América Latina, el daño vascular y cuadros trombóticos avanzados representan la principal causa de muerte en pacientes con LES (Pons-Estel *et al*, 2010). La presencia de autoanticuerpos en los sueros de pacientes con LES se ha considerado un estímulo para inducir a los neutrófilos a formar NETs.

En el presente trabajo se encontró que sueros de pacientes con LES pueden activar a los neutrófilos para que estos formen NETs. En contraste, los sueros de personas sanas no inducen la formación de NETs (Kraaij *et al*, 2016). Además de que a menor dilución se utilicen los sueros como estímulo, mayor efecto se observó sobre los neutrófilos. Asimismo, las micrografías revelan mayor descondensación de núcleos y ADN extracelular al utilizar los sueros en una dilución de 1/500. Sin embargo, el efecto de los sueros a una dilución 1/500 no fue mayor al del PMA. Aunado a lo anterior, la cuantificación de las NETs apoya el hecho de la poca liberación de ADN extracelular al utilizar los sueros como estímulo respecto al tratamiento con PMA. Estas observaciones indican que los sueros inducen la formación de NETs de una manera débil. Por otra parte, la cuantificación de las NETs señalan a los sueros como estímulos lentos, comenzado su efecto aproximadamente a los 120 minutos, de manera muy similar a lo que ocurre con el PMA. Por consiguiente, esto nos indica que los sueros de pacientes con LES son estímulos lentos y débiles en comparación con el PMA (Behnen *et al*, 2014). A pesar de que los sueros de estas personas son estímulos lentos y débiles, el LES es una enfermedad autoinmune crónica, de tal manera que en los pacientes con LES

podiera estar ocurriendo un efecto muy similar. Lo que traería como consecuencia un daño continuo y persistente a nivel sistémico.

El uso de los sueros de pacientes con alguna enfermedad autoinmune como inductores de NETS no es nuevo, debido a que previamente se había reportado la formación de NETs al utilizar suero de pacientes con SAF y AR (Khandpur *et al*, 2013; Yalavarthi *et al*, 2015), estos antecedentes y este trabajo confirman la participación de algún componente en el suero de los pacientes con enfermedades autoinmunes que tenga algún efecto sobre los neutrófilos. Por consiguiente, algunos grupos de investigación han sugerido que los anticuerpos generados durante cualquier enfermedad autoinmune participan de manera activa a través de la formación de inmunocomplejos (IC) tanto solubles como inmóviles, convirtiéndose en potentes inmunógenos con alta capacidad de activar neutrófilos y llevar a cabo la liberación de NETs (Chen *et al*, 2012; Behnen *et al*, 2014). Asimismo, el efecto de los sueros de pacientes con LES apuntaba de primera instancia a una posible relación entre los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL como los responsables del efecto sobre neutrófilos, similar a la presencia de anticuerpos antiproteínas citrulinadas (ACPA, del inglés *anti-citrullinated protein antibodies*), ANCA y anticuerpo anti- β (2)-glicoproteína I ($\alpha\beta_2$ GPI) provenientes de sueros de pacientes con AR, VPV y SAF, respectivamente. En donde dichas enfermedades se ha encontrado una correlación directa entre los anticuerpos ACPA, ANCA y β_2 GPI en suero, y su papel como los responsables de inducir NETs en neutrófilos (Kessenbrock *et al*, 2009; Khandpur *et al*, 2013; Yalavarthi *et al*, 2015). No obstante, los resultados del presente trabajo sugieren que no existe relación entre la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL en suero, y su capacidad de llevar a cabo formación de NETs. Sin embargo, no se descarta la participación de otros autoanticuerpos menos prevalentes que también pueden ser producidos durante el LES y pudieran tener una relación directa como ocurre con los anticuerpos de otras enfermedades autoinmunes mencionadas anteriormente.

Por otro lado, se ha señalado a otros componentes del suero como promotores en la patogénesis y complicación del LES, entre estos componentes se

ha reportado la participación de la enzima ADNasa I; enzima encargada de mantener la homeostasis del ADN extracelular presente en las NETs. De modo que, en individuos con LES, la función de la enzima ADNasa I se encuentra deficiente en comparación con individuos sanos (Hakkinm *et al*, 2010; Lefflet *et al*, 2012). Y por lo tanto las NETs que son producidas en individuos con LES son degradadas deficientemente por la ADNasa I, provocando que sean potentes inmunógenos. Aunado a lo anterior se ha detectado un elevado nivel de citocinas presentes en suero de pacientes con LES (Ding *et al*, 2006; García-Romo *et al*, 2011; Lin *et al*, 2011; Khandpur *et al*, 2013; Behen *et al*, 2014; Kessenbrock *et al*, 2009). Por consiguiente, se ha sugerido una importante participación de las citocinas durante el LES. De manera que las citocinas potencian la actividad del sistema inmunológico de los pacientes, provocando mayor actividad en leucocitos, incluyendo a los neutrófilos, implicando daño en diferentes órganos. Otros grupos de trabajo han reportado a la IL-8 como inductora de NETs (Brinkmann *et al*, 2004) y probablemente al TNF- α , IL-17 e IL-1 β (Khandpur *et al*, 2013; Kessenbrock *et al*, 2009; Lin *et al*, 2011). Todas las citocinas mencionadas anteriormente han sido detectadas por encima de niveles normales en el suero de pacientes con alguna enfermedad autoinmune, incluyendo el LES (Ding *et al*, 2006). El papel de dichas citocinas durante el LES aun no es claro, pero existen la propuesta de la secreción de IL-17 y IL-8 tienen un efecto indirecto al reclutar neutrófilos o inducir la formación de NETs (Villanueva *et al*, 2011). Dicho mecanismo ha sido relacionado con la participación de otras células como las células dendríticas plasmocitoides, estas células reconocen a las NETs como antígenos y promueven la secreción de TNF- α , potenciando la activación de los neutrófilos y llevando a cabo una mayor formación de NETs, lo que trae como consecuencia la exposición de más autoantígenos convirtiéndose en un sistema de retroalimentación vicioso (García-Romo *et al*, 2011). Por otro lado, algunos trabajos relacionan directamente la alta concentración de TNF- α en suero de pacientes con VPV y RA, y la capacidad de los anticuerpos ANCA y ACPA respectivamente, para inducir la formación de NETs (Kessenbrock *et al*, 2009; Khandpur *et al*, 2013). Dicho mecanismo no se descarta en LES, ni tampoco que los sueros del presente trabajo presenten altas

concentraciones de alguna citocina o inclusive esté implicada la actividad de la ADNasa I. Tampoco que la alta concentración de otras proteínas presentes en suero como la proteína reactiva C, ESR y C5a sean los responsables de inducir NETs como se ha observado en pacientes con AR (Khandpur *et al*, 2013). Por consiguiente, no se excluye ninguno de los factores mencionados anteriormente sea el responsable de la actividad de los sueros sobre los neutrófilos.

La información del estadio de los 17 pacientes de acuerdo con el SLEDAI-2K permitió indagar más sobre el efecto de los sueros, encontrando una tendencia entre el estadio del paciente y el efecto sobre los neutrófilos, de tal manera que el suero de pacientes con mayor índice tuvo mayor efecto sobre los neutrófilos induciendo mayor cantidad de NETs, mientras que los sueros de pacientes con un índice menor presentaron menor actividad. Las micrografías y la cuantificación de NETs apoyan este hecho ya que en ambos casos los sueros más activos son los que presentan un SLEDAI-2K mayor. Nakazawa y colaboradores (2014), reportaron algo similar con los anticuerpos presentes en suero de individuos con poliangeítis microscópica (PAM), observando una tendencia entre el índice de enfermedad según la clasificación BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) y la formación de NETs, resaltando a los anticuerpos provenientes de individuos más enfermos tenían mayor actividad sobre los neutrófilos. Este hecho indica la existencia de una tendencia de los pacientes más enfermos a tener mayor formación de NETs lo que es contraproducente ya que las NETs son inmunógenos que pueden causar daño vascular debido a la formación de trombos. Además, estas NETs pueden precipitarse en glomérulos causando nefritis, en articulaciones causando artritis, en pulmones causando pleuritis y en casos más extremos la muerte.

Este y los trabajos mencionados anteriormente apoyan la participación de distintos componentes presentes en sueros de pacientes con alguna enfermedad autoinmune como estímulos multifactoriales. Provocando una mayor formación de NETs, repercutiendo directamente en una peor calidad de vida para los pacientes con alguna enfermedad autoinmune.

Conclusiones

Los sueros de pacientes con LES inducen la formación de NETs en neutrófilos de donadores sanos. Mientras que los sueros de donadores sano no tienen ningún efecto sobre los neutrófilos.

Los sueros de pacientes con LES estimulan a los neutrófilos a formar NETs aproximadamente a los 120 minutos muy similar al PMA, lo que lo convierte a los sueros en un estímulo lento. Además, los sueros de pacientes con LES inducen una débil formación de NETs en comparación con el PMA.

El efecto de los sueros de pacientes con LES sobre los neutrófilos es aparentemente independiente de la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y anticuerpos AL. Implicando a otros compuestos presentes en el suero como los posibles responsables del efecto sobre neutrófilos.

Existe una tendencia entre el estadio SLEDAI-2K de los pacientes con LES y el efecto de su suero sobre neutrófilos. Teniendo mayor efecto aquellos sueros de pacientes con un estadio de la enfermedad más avanzado de acuerdo con el SLEDAI-2K.

Perspectivas

Los resultados del presente trabajo señalan que la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL en suero de pacientes con LES aparentemente no son los responsables del efecto en neutrófilos, sin embargo para confirmar completamente que los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL o inclusive otros anticuerpos menos prevalentes pudieran tener efecto en neutrófilos, se propone eliminar todos los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con LES y volver a probar experimentalmente cada suero, en caso de que los sueros continúen estimulando a los neutrofilos a formar NETs, se propone realizar la cuantificación de citocinas que han sido reportadas como inductoras de NETs en los sueros de estos pacientes con LES.

Anexos

Anexo I: Preparación de disoluciones

Todas las disoluciones una vez filtradas deben manejarse en condiciones estériles y almacenarse a 4° C.

Solución de PBS (Solución salina amortiguadora de fosfatos)

- NaCl 138 mM
- KCl 2.7 mM
- Na₂HPO₄ 8.1 mM
- KH₂PO₄ 1.2 mM

Los reactivos se disuelven en agua bidestilada. Posteriormente se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1N o NaOH 50% (v/v). Después se afora al volumen deseado y en condiciones estériles se realiza el filtrado a través de una membrana con poros de 0.22 µm de diámetro (número de catálogo GVWP04700, Millipore).

Solución de Dextran T 500 al 6 %

- 3 g de Dextran T 500 (Numero de catálogo 170320.01, Pharmacia Fine Chemicals, Suecia).
- 50 ml de PBS (Solución salina amortiguadora de fosfatos).

Se disuelve el Dextran T 500 en 30 ml de PBS, posteriormente se afora a 50 ml y en condiciones estériles se esteriliza mediante un filtro con una membrana de 0.22 µm de diámetro.

Solución hipotónica

- NaCl (35 mM).
- HEPES (20 mM).
- Albúmina sérica bovina (1 mg/ml)
(Numero de catálogo 10 735 094
001; Roche, Alemania).

Solución hipertónica

- NaCl (275 mM).
- HEPES (20 mM).
- Albúmina sérica bovina (1 mg/ml)
(Numero de catálogo 10 735 094
001; Roche, Alemania).

Los reactivos excepto la albumina sérica bovina, se disuelven en agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1 N o NaOH 50 % (v/v). Después se afora al volumen deseado, se adiciona la albúmina sérica bovina y se dejar disolver sin agitación. En condiciones estériles se realiza el filtrado a través de una membrana con poros de 0.22 μm de diámetro.

Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute médium (RPMI) - 1640







- Medio de cultivo RPMI 1640 (número de catálogo R6504; Sigma-Aldrich, USA)

El medio de cultivo se disuelve en 700 ml de agua bidestilada. Posteriormente se ajusta el pH a 7.4 con HCl a 1 N y NaOH 50 % (v/v). Posteriormente se afora a un 1000 ml, se suplementa con glutamina a 2 mM, se esteriliza mediante un filtro con una membrana de 0.22 μm de diámetro.

Anexo II

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de los núcleos descondensados respecto a los núcleos totales. Se clasificaron en rangos de acuerdo al porcentaje de descondensación de los núcleos de tal manera que: (-) Nula capacidad de formar NETs, (+) poca capacidad de formar NETs, (++) moderada capacidad de formar NETs; (+++) alta capacidad de formar NETs y (+++++) fuerte capacidad de formar NETs.

Dilución	1/10	1/100	1/500
Suero	Núcleos descondensados (%)		
Sin suero	4.49±0.99	4.49±0.99	4.49±0.99
20 nM PMA	91.29±1.59	91.29±1.59	91.29±1.59
Suero Sano	4.62±0.99	8.84±3.99	6.98±1.40
I	49.39 ± 5.79	54.78 ± 2.19	25.48 ± 3.05
II	12.03 ± 1.89	28.94 ± 5.15	33.48 ± 1.43
III	10.81 ± 1.04	14.23 ± 1.01	16.67 ± 4.76
IV	27.55 ± 1.66	25.20 ± 1.94	23.31 ± 2.37
V	9.88 ± 3.41	12.71 ± 1.48	7.80 ± 0.87
VI	8.58 ± 2.31	29.11 ± 1.1	22.44 ± 2.61
VII	7.94 ± 2.32	26.31 ± 1.52	26.05 ± 1.05
VIII	12.14 ± 0.64	32.29 ± 5.44	21.30 ± 2.58
IX	7.94 ± 1.60	25.44 ± 6.65	29.17 ± 4.90
X	3.73 ± 1.26	4.86 ± 1.54	8.68 ± 0.52
XI	3.12 ± 2.11	9.09 ± 1.37	39.77 ± 3.91
XII	4.93 ± 0.61	48.27 ± 4.62	28.22 ± 2.21
XIII	7.06 ± 1.06	52.33 ± 6.24	46.59 ± 5.65
XIV	3.30 ± 1.90	11.46 ± 6.61	13.97 ± 8.06
XV	3.48 ± 2.01	0.23 ± 0.13	4.43 ± 2.55
XVI	8.60 ± 1.37	46.44 ± 3.02	54.86 ± 4.45
XVII	5.33 ± 1.25	5.12 ± 1.71	31.12 ± 3.07

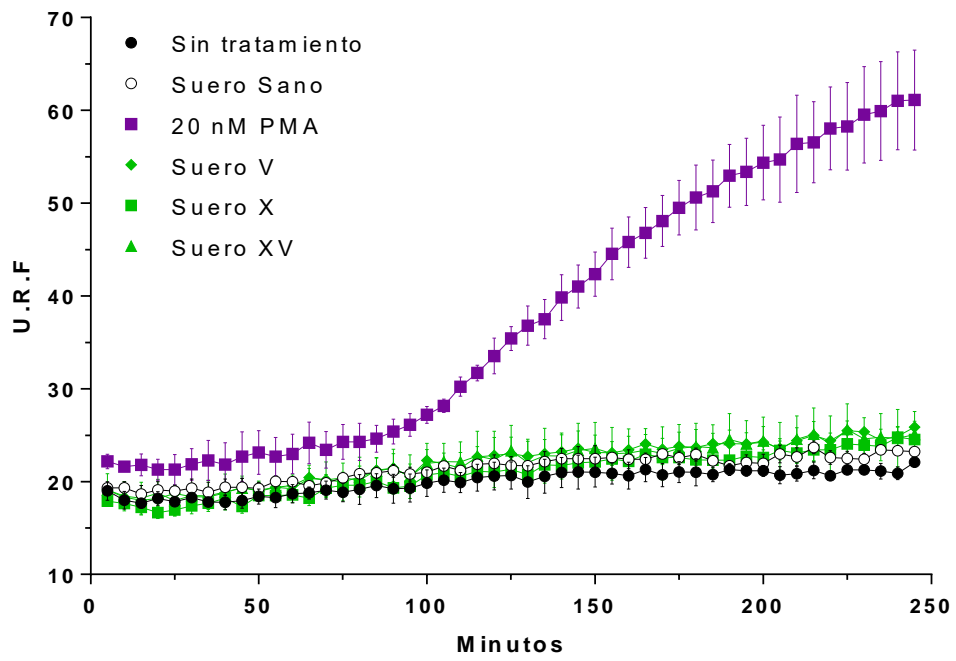
>75%	+++++	
60-74%	++++	
45-59%	+++	
30-44%	++	
15-29%	+	
0-14%	-	

Anexo III

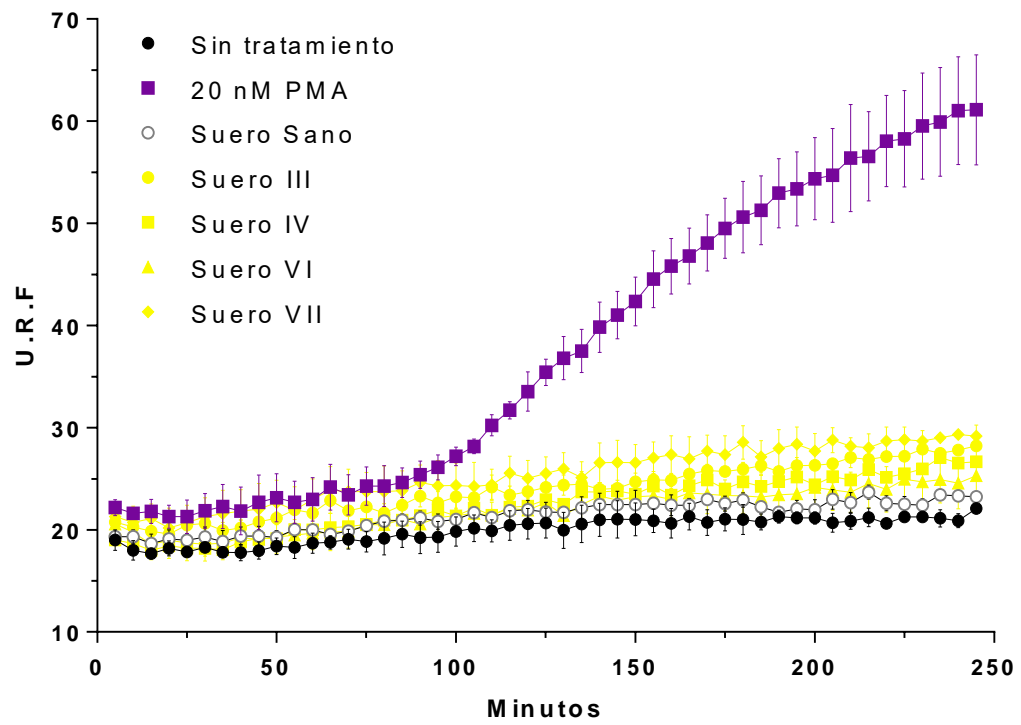
A continuación, se muestran la cuantificación de NETs inducida por cada uno de los 17 sueros de pacientes con LES, todas las cuantificaciones fueron agrupadas de acuerdo con la capacidad de formación de NETs de cada suero, de tal manera que hubo sueros que tuvieron: ninguna capacidad de formación de NETs (**verde**), poca formación de NETs (**amarillo**), moderada formación de NETs (**naranja**) y alto formación de NETs (**rojo**). Sin embargo, se encontró nuevamente que no hay correlación entre la capacidad de formación de NETs de los sueros, y la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-RNP/Sm y AL, ya que las cuantificaciones presentan sueros pertenecientes a los 4 grupos de tal manera que hay cuantificaciones de sueros con **ninguna**, **poca**, **moderada** o **alta** formación de NETs. Por lo que no existe una correlación directa.

Grupo 1	Anti-RNP/Sm		AL	
	<i>Positivo</i>		<i>Positivo</i>	
Suero X	Suero II	Suero IX	Suero I	
Grupo 2	Anti-RNP/Sm		AL	
	<i>Negativo</i>		<i>Negativo</i>	
Suero III	Suero IV	Suero XI	Suero XII	
Grupo 3	Anti-RNP/Sm		AL	
	<i>Positivo</i>		<i>Negativo</i>	
Suero V	Suero VI	Suero XIII	Suero XIV	
Grupo 4	Anti-RNP/Sm		AL	
	<i>Negativo</i>		<i>Positivo</i>	
Suero XV	Suero XVII	Suero VIII	Suero XVII	Suero XVI

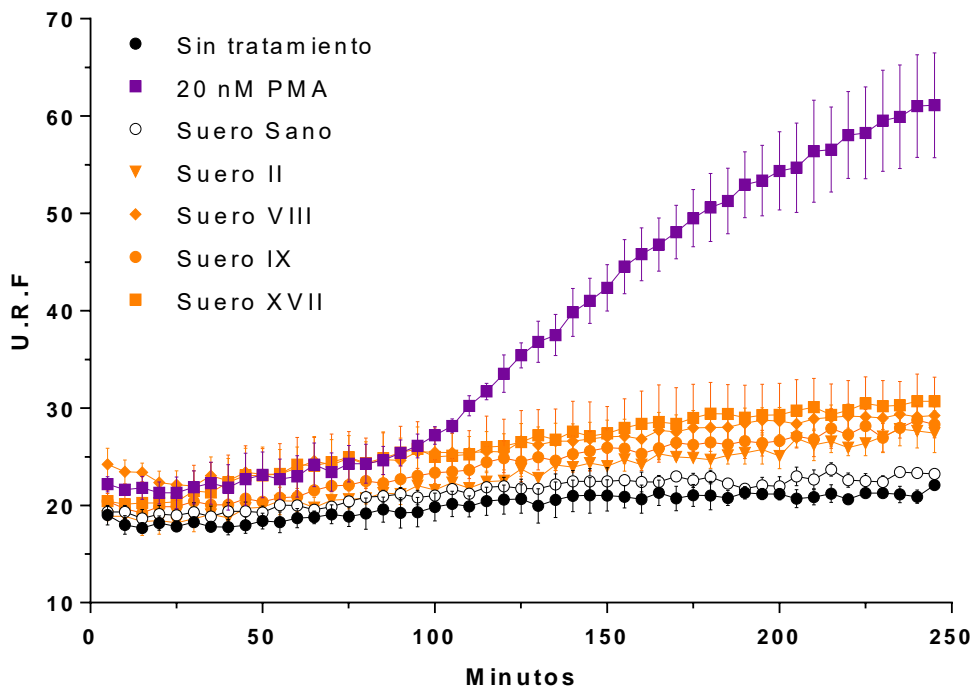
Nula formación de NETs



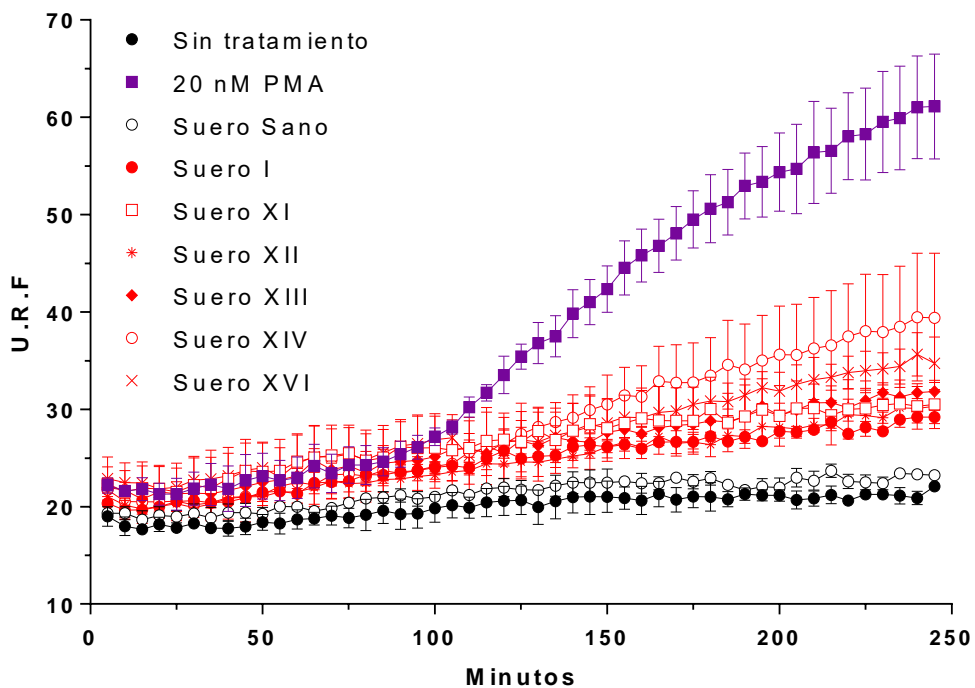
Poca formación de NETs



Moderada formación de NETs



Alta formación de NETs



Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, S. (2012) *Inmunología celular y molecular*. 7 a (ed). Elsevier. España, Barcelona. pp: 1.
- Alemán, O.R. (2016) *Caracterización de redes extracelulares de neutrófilo (NETs) inducida por anticuerpos*. Tesis de maestría. Por la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alemán, O. R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2016). Differential Use of Human Neutrophil Fc γ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Journal of Immunology Research*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
- Aleyd, E., van Hout, M. W. M., Ganzevles, S. H., Hoeben, K. A., Everts, V., Bakema, J. E., & van Egmond, M. (2014). IgA Enhances NETosis and Release of Neutrophil Extracellular Traps by Polymorphonuclear Cells via Fc α Receptor I. *The Journal of Immunology*, 192(5), 2374–2383. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300261>
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*, 30, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- Baker, V. S., Imade, G. E., Molta, N. B., Tawde, P., Pam, S. D., Obadofin, M. O., Sagay, S., Egah, D.Z., Iva, D., Afolabi, B.B., Baker, M., Ford, K., Ford, R., Roux, K.H., & Keller III, T. C. S. (2008). Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malaria Journal*, 7(41), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-41>

- Bastías, C., Sidgman, F., & C., R. (2015). Laboratorio De Inmunología En La Práctica Clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 764–775. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.005>
- Behnen, M., Leschczyk, C., Möller, S., Batel, T., Klinger, M., Solbach, W., & Laskay, T. (2014). Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *The Journal of Immunology*, 193(4), 1954–1965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400478>
- Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abed, U. A., Kühn, L. I., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., & Zychlinsky, A. (2013). A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in Immunology*, 4(48), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00048>
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 577–582. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1710>
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303, 1532–1535.
- Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Amanianda, V., Nietzsche, S., Thywißen, A., Jeron, A., Latgé, J.P., Brakhage, A A. & Gunzer, M. (2010). Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000873>

- Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological Reviews*, 83(2), 581–632. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2002>
- Chaplin, D. A. (2010). Overview of the Immune Response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 1–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00601-1>
- Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D. D., Stan, R., Croce, K. & Mayadas, T. N. (2012). Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood*, 120(22), 4421–4431. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-401133>
- Cugno, M., Gualtierotti, R., Tedeschi, A., & Meroni, P. L. (2014). Autoantibodies to coagulation factors: From pathophysiology to diagnosis and therapy. *Autoimmunity Reviews*, 13(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.08.001>
- Cunha, J. S., & Gilek-Seibert, K. (2013). Systemic Lupus Erythematosus: A Review of the Clinical Approach to Diagnosis and Update on Current Targeted Therapies. *Rhode Island Medical Journal*, 99(12), 23–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27902995>
- D’Cruz, D. P., Khamashta, M. A., & Hughes, G. R. (2007). Systemic Lupus Erythematosus. *The Lancet Core Clinical Collection*, 369, 587–596. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60279-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60279-7)
- Danchenko, N., Satia, J. A., & Anthony, M. S. (2006). Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 15(5), 308–318. <https://doi.org/10.1191/0961203306lu2305xx>
- Dema, B., & Charles, N. (2016). Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. *Antibodies*, 5(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antib5010002>

- Ding, D., Mehta, H., McCune, W. J., & Kaplan, M. J. (2006). Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, 177(9), 5878–5889. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.5878>
- Dolgushin, I. I., & Andreeva, I. S. (2009). Neutrophil extracellular traps: method of detection and assessment of bacterial trapping efficacy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, (2), 65–67.
- Dumitru, C. A., Moses, K., Trelakis, S., Lang, S., & Brandau, S. (2012). Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(8), 1155–1167. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1294-5>
- Fortunati, E., Kazemier, K. M., Grutters, J. C., Koenderman, L., & Van Den Bosch, V. J. M. M. (2009). Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 155(3), 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03791.x>
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, 12(11), 1035–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>. Phenotypic
- Ganapathy, Sivadas, Vedam, V., Vini, R., & Arunachalam, R. (2017). Autoimmune Disorders–Immunopathogenesis and Potential Therapies. *Journal of Young Pharmacists*, 9(3), 15–22. <https://doi.org/10.5530/jyp.2017>

- García-García, E., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2013). A Simple and Efficient Method to Detect Nuclear Factor Activation in Human Neutrophils by Flow Cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, (74), 1–7. <https://doi.org/10.3791/50410>
- Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., Barrat, F.J., Banchereau, J. & Pascual, V. (2011). Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medical*, 3(73). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001201>.Netting
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44(3), 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Froment, G. S., Soares, R. P. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2009). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6748–6753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900226106>
- Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., & Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*, 7, 75–77. <https://doi.org/10.1038/nchembio.496>
- Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Hermann, M., Voll, R.E. & Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9813–9818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107>

- Hampton, M.B., Kettle, A.J., & Winterbourn, C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92:3007-3017.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2016). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System Linked references are available on JSTOR for this article : Regulation of Adaptive Immunity by the, 327(5963), 291–295.
- Jesmin, T., Roy, R. R., Anjum, M. F., & Akter, M. (2017). Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies In Systemic Lupus Erythematosus And Lupus Nephritis: An Overlapping Syndrome. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 16(3), 6–8. <https://doi.org/10.9790/0853-1603050608>
- Kaplan J M, & Radic, M. (2013). Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *Journal of Immunology*, 189(6), 2689–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>. Neutrophil
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemärck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Gröne, H.J., Brinkmann, V. & Jenne, D. E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*, 15(6), 623–625. <https://doi.org/10.1038/nm.1959>
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D.A., Pennathur, S. & Kaplan, M. J. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine*, 5(178), 1–10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., & Osborne, B.A. (2007) *Inmunología de Kuby*. 6 a (ed). Mc-Graw Hill. México, D.F. pp 1.

- Kobayashi, Y. (2015). Neutrophil biology: An update. *EXCLI Journal*, 14, 220–227. <https://doi.org/10.17179/excli2015-102>
- Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13, 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kraaij, T., Tengström, F. C., Kamerling, S. W. A., Pusey, C. D., Scherer, H. U., Toes, R. E. M., Rabelink, T.J., van Kooten, C. & Teng, Y. K. O. (2016). A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. *Autoimmunity Reviews*, 15(6), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.018>
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarata, C., Roos, D., Skokowa, J., & Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
- Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2(3), 98–108. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>
- Lakschevitz, F. S. (2016). *Identification of CD Marker Expression and Neutrophil Surface Marker Changes in Health and Disease using High- throughput screening flow cytometry*. Thesis for the degree of Master's of Science. By University of Toronto. Retrieved from https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/75103/3/Lakschevitz_Flavia_201611_MSc_thesis.pdf
- Lakschevitz, F. S., Hassanpour, S., Rubin, A., Fine, N., Sun, C., & Glogauer, M. (2016). Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Experimental Cell Research*, 342(1), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.007>

- Lapponi, M. J., Carestia, A., Landoni, V. I., Rivadeneyra, L., Etulain, J., Negrotto, S., Pozner, R.G. & Schattner, M. (2013). Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 345(3), 430–437. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.202879>
- Lee, K. H., Kronbichler, A., Park, D. D.-Y., Park, Y., Moon, H., Kim, H., Choi, J.H., Choi, Y., Shim, S., Lyu, I.S., Yun, B.H., Han, Y., Lee, D., Lee, S.Y., Yoo, B.H., Lee, K.H., Kim, T.L., Kim, H., Shim, J.S., Nam, W., So, H., Choi, S., Lee, S. & Shin, J. II. (2017). Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*, 16, 1160–1173. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.09.012>
- Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tyden, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A.A. & Blom, A. M. (2012). Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. *The Journal of Immunology*, 188(7), 3522–3531. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102404>
- Lemerle, J., & Renaudineau, Y. (2016). Anti-Sm and Anti-U1-RNP Antibodies: An Update. *Lupus Open Access*, 1(3), 1–4.
- Lim, M. B. H., Kuiper, J. W. P., Katchky, A., Goldberg, H., & Glogauer, M. (2011). Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(4), 771–776. <https://doi.org/10.1189/jlb.1010549>
- Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E.C., Kaplan, M.J. & Bruce, A. T. (2011). Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 187(1), 490–500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100123>

- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11, 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- Mesa, M. A., & Vasquez, G. (2013). NETosis. *Autoimmune Diseases*, 1–7.
- Migliorini, P., Baldini, C., Rocchi, V., & Bombardieri, S. (2005). Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity*, 38(1), 47–54. <https://doi.org/10.1080/08916930400022715>
- Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1283–1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20122220>
- Mulliez, S. M. N., Keyser, F. De, Verbist, C., Vantilborgh, A., Wijns, W., Beukinga, I., & Devreese, K. M. J. (2014). Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome : report of two cases and review of the literature. *Lupus*, 0, 1–10.
- Murphy, K; Travers, P. & Walport, M (2009) *Inmunobiología de Janeway*. 7^a (ed). Mc Graw Hill. México, D.F. pp 3
- Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T., & Ishizu, A. (2014). Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 990–997. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013060606>
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>

- Nel, J. G., Theron, A. J., Pool, R., Durandt, C., Tintinger, G. R., & Anderson, R. (2016). Neutrophil extracellular traps in health and disease. *South African Journal of Science*, *112*(1/2), 36–45. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14352>
- Petri, M. (2000). Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Journal of Autoimmunity*, *15*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0409>
- Petri, M. (2006). Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome. In *Hughes Syndrome* (pp. 22–28). https://doi.org/10.1007/1-84628-009-5_3
- Pillay, J., Braber, I. Den, Vrisekoop, N., Kwast, L. M., Boer, R. J. De, Borghans, A. M., Tesselaar, K. & Koenderman, L. (2010). Brief report In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, *116*(4), 625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>.
- Pons-Estel, G. J., Alarcón, G. S., Scofield, L., Reinlib, L., & Cooper, G. S. (2010). Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *39*(4), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.10.007>
- Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñiz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S. & Estrada-García, I. (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, *89*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.09.009>
- Ramsey-Goldman, R., & Manzi, S. (2000) Systemic lupus erythematosus. Women and Health. Academic Press 2000: 704
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>

- Rosales, C., Demaurex, N., Lowell, C. A., & Uribe-querol, E. (2016). Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Immunology Research*, 1–2.
- Secretaría de Salud (SSA). (2013). *¿Qué Lupus Eritematoso Sistémico? Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* (Vol. 30). México.
- Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., & Eitzen, G. (2014). Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00448>
- Steinberg, B. E., & Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(379), 1–5. <https://doi.org/10.1126/stke.3792007pe11>
- Urlaub, H., Raker, V. A., Kostka, S., & Lührmann, R. (2001). Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *The EMBO Journal*, 20(1 & 2), 187–196. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.187>
- Veda, P. (2011). Why are neutrophils polymorphonuclear? *European Journal of Inflammation*, 9(2), 85–93.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., Rubin, C. J., Zhao, W., Olsen, S. H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M.F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A.T., & Kaplan, M. J. (2011). Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, 187(1), 538–552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100450>
- Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*, 278(4), 369–395. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>

- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(S1), 2–8. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S1>
- Yalavarthi, S., Gould, T. J., Rao, A. N., Mazza, L. F., Morris, A. E., Núñez-Álvarez, C., Hernández-Álvarez, D., Bockenstedt, P.L., Liaw, P.C., Cabral, A.R., & Knight, J. S. (2015). Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: A newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheumatology*, 67(11), 2990–3003. <https://doi.org/10.1002/art.39247>
- Yam-Puc, J. C., García-Marín, L., & Sánchez-Torres, L. E. (2012). Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gaceta Medica de Mexico*, 148(1), 68–75.
- Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013). NETosis : how vital is it ? *Blood*, 122(16), 2784–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>
- Yu, Y., & Su, K. (2013). Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *Journal Clinical and Cellular Immunology*, 4, 139–152. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000139>.Neutrophil

